

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Titel

**Vergleich von autologem versus gepooltem Humanserum bei der
Generierung dendritischer Zellen zur therapeutischen Vakzinierung
bei Akuter Myeloischer Leukämie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Wolfgang Munker

aus

München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries

Prof. Dr. Barbara Schraml

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Barbara Beck

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Einleitung	5
2.1. Überblick: Dendritische Zellen und Immunsystem	5
2.2. Physiologische Funktionen dendritischer Zellen	6
2.3. Dendritische Zellen im klinischen Einsatz.....	8
2.4. Akute Myeloische Leukämie.....	11
2.5. Generierung dendritischer Zellen	12
2.6. Fragestellung	12
3. Methoden, Probanden und Patienten	13
3.1. Zellgewinnung	13
3.2. Isolierung von PBMCs.....	13
3.3. Züchtung von reifen DCs	14
3.4. Zellzählung, Zellviabilität und Recovery	15
3.5. Durchflußzytometrie und Phenotyp-Analyse	15
3.5.1. Prinzip der Durchflußzytometrie	15
3.5.2. Phänotypanalyse mittels FACS Calibur	16
3.6. Signal 3 Assay	17
3.7. IL-10/-12 ELISA	19
3.7.1. Erläuterung zu IL-10 und IL-12	19
3.7.2 Durchführung des IL-10/12 ELISA	19
3.8. Migrations Assay	20
3.8.1. Prinzip	20
3.8.2. Durchführung des Migrationsassays	22
3.9. Statistische Auswertungen	22
3.10. Probanden und Patienten	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Zellzahl und Recovery.....	23
4.2. Viabilität	25
4.3. Durchflußzytometrie und Phänotyp-Analyse	27
4.3.1. Vorwärts-/ Seitwärts Scatter	27
4.3.2. Phänotyp Analyse	30
4.4. Signal 3 Assay und ELISA IL-10/IL-12	31
4.5. Migration Assay.....	32
5. Diskussion	34
6. Zusammenfassung.....	37
7. Danksagung.....	38
8. Literaturverzeichnis.....	41

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AHS	<i>Autologes Humanserum</i>
AHS-DCs	<i>DCs mit der Zugabe von autologem Humanserum generiert</i>
AML	<i>Akute myeloische Leukämie</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APML	<i>Akute Promyelozyten Leukämie</i>
ATRA	<i>all-trans Retinsäure</i>
BSA	<i>Engl.: Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CR	<i>Komplette Remission</i>
DC	<i>Dendritische Zelle (Engl.: Dendritic cell)</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
FACS	<i>Engl.: fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GMP	<i>Guten Herstellungspraxis (Engl.: Good Manufacturing Practice)</i>
GM-CSF	<i>Engl.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL	<i>Interleukin</i>
MHC II	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex (Engl.: major histocompatibility complex)</i>
MTP	<i>Mikrotiterplatte</i>
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
NAZ	<i>Nicht-adhärenzte Zellen</i>
NK-T-Zellen	<i>Natural Killer Zellen</i>
NSCLC	<i>Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom</i>
PAMPs	<i>Engl.: Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes</i>
PBS	<i>Engl.: Phosphate buffered saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PFS	<i>progressionsfreie Überleben</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E₂</i>
PHS	<i>gepooltes Humanserum</i>
PHS-DCs	<i>DCs mit der Zugabe von gepooltem Humanserum generiert</i>
PSA	<i>Prostataspezifisches Antigen</i>
PSM-P2	<i>Engl.: prostate-specific membrane antigens</i>
TH1-Zellen	<i>T1-Helferzellen</i>
TTP	<i>Engl.: Time to progression</i>
VLE-RPMI	<i>Engl.: Very Low Endotoxin-RPMI</i>
WT-1	<i>Engl.: Wilm's tumor gene product</i>

2. Einleitung

2.1. Überblick: Dendritische Zellen und Immunsystem

Dendritische Zellen (Abk.: DC, engl.: dendritic cell) wurden erstmals 1975 von der Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger R. M. Steinman als solche identifiziert und isoliert. In lymphatischen Organen entdeckten sie diese einzigartige Zellpopulation, die im Einzelnen durch ihre baumähnliche Morphologie (altgriechisch: Dendron – deutsch: Baum) auffiel [1].

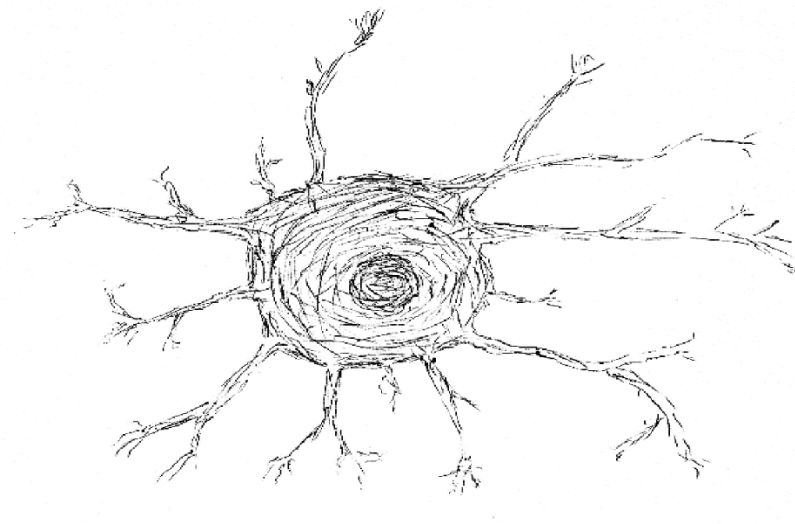


Abb. 1.1.: Dendritische Zelle

Allgemein teilt man das Immunsystem in das Angeborene (unspezifische) und in das Erworbene (spezifisch, adaptiv) ein.

Zum angeborenen Immunsystem gehören die anatomischen und physiologischen Barrieren (Haut, Epithelien). Außerdem werden Phagozytose, Entzündungsreaktionen, Abwehr durch Granulozyten und Natural Killer Zellen (NK-T-Zellen), sowie das Komplementsystem diesem System zugeordnet. Die Mechanismen greifen durch ihre Barrierefunktion sofort oder mittels anderer Abläufe binnen weniger Minuten.

Auf der anderen Seite steht das erworbene Immunsystem, dessen Zellen dazu in der Lage sind, die Antigene der Erreger zu erkennen und ihre erworbene Information wiederum anderen Zellen des Systems (CD4⁺-T-Helferzellen, CD8⁺-Cytotoxische-T-Zellen,

regulatorische T-Zellen, T-Gedächtniszellen etc.) zu kommunizieren, die über direktem oder indirektem Wege den Erregern schaden. Zu den Antigenpräsentierenden Zellen gehören DCs, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten.

Makrophagen sind im Gegensatz zu DCs in der Regel nicht befähigt in lymphatische Organe zu migrieren und dienen deswegen zur Aufrechterhaltung einer schon stattgefundenen Immunreaktion. Dies geschieht durch die Antigenpräsentation bereits bekannter Antigene an vor Ort vorkommende T-Lymphozyten.

B-Lymphozyten endozytieren mit Hilfe ihres B-Zellrezeptors Antigene und präsentieren diese ebenfalls. Werden sie nun von T-Lymphozyten erkannt, kommt es zu einer gegenseitigen Aktivierung. Neben anderen Reaktionen sezernieren die B-Lymphozyten dann Antikörper, die an das spezifische Antigen wiederum binden können.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Generierung dendritischer Zellen zum Einsatz gegen die Minimal Residual Disease (Abk.: MRD) der Akuten Myeloischen Leukämie (Abk.: AML).

2.2. Physiologische Funktionen dendritischer Zellen

DCs sind für ein breites Spektrum an Immunantworten verantwortlich, das von der Entwicklung der immunologischen Eigentoleranz bis hin zur Entstehung einer ausgeprägten zellulären und humoralen antigen-spezifischen Immunität reicht [2]. Dies resultiert vor Allem aus vier charakteristischen Eigenschaften der DCs: 1. Ihre Lokalisation in Organen mit hoher Antigen-Exposition; 2. Ihre Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und diese in großer Zahl den T-Zellen zu präsentieren; 3. Ihre Fähigkeit auf eine Vielzahl von Stimuli zu antworten, und 4. Ihre Eigenschaft unter diversen, funktionell unterschiedlichen Bedingungen zu reifen [3].

DCs findet man vor Allem auf Exoantigen exponierten Körperoberflächen und Körperöffnungen wie Haut, Pharynx, oberem Ösophagus, Vagina, Ectocervix und Anus, und zum Beispiel in der Mukosa des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes [3].

Die Antigenaufnahme kann in situ erfolgen, gefolgt von der Migration von DCs in die Lymphknoten über afferente Lymphgefäße, oder direkt im Lymphknoten selbst, falls lösliche Antigene auf die dort befindlichen DCs treffen [2].

In Geweben befindliche DCs sind normalerweise unreif (engl.: immature Dendritic Cells; Abk.: iDCs), das heißt sie haben ein niedriges Potential Zytokine zu exprimieren, dafür jedoch eine hohe Kapazität Antigene aufzunehmen.

Darüber hinaus exprimieren sie MHC II Moleküle zu meist in späten endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten, niedrige Konzentrationen an kostimulatorischen Molekülen (z.B. OC40L, CD40, CD70 und CD86) und einige spezielle Chemokinrezeptoren [2].

Die Kombination verschiedener Zytokine und Stimuli ist entscheidend für Entstehung reifer DCs aus Monozyten mit unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen.

Um den Reifezustand zu erreichen, muss eine Vielzahl an Stimuli auf die DCs einwirken. Zwar spielen hierbei Zytokine und Liganden (IFN γ , IL-4, TNF, IFN α , IL-15, TSLP, CD40 etc.) eine große Rolle, die Interaktion mit mikrobiellen Antigenen (engl.: Pathogen-associated molecular patterns, Abk.: PAMPs) allerdings bringt immunologisch aktivere Zellen hervor [3, 4].

Nachdem DCs ihre migratorische Fähigkeit und ihre Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation erlangt haben, werden sie per Definition als reif bezeichnet [5]. Neben diesen Eigenschaften exprimieren diese DCs nun eine Reihe an verschiedener intrazellulärer und Oberflächenrezeptoren (CLRs, TLRs, intrazelluläre Helikasen, etc.), die immunologisch von großer Bedeutung sind [4].

Heute sind sie als modulatorische Zellen des erworbenen und angeborenen Immunsystems, betreffend onkologischer Therapiestrategien, von großer klinischer Relevanz. Auf Grund Ihrer hohen Potenz tumorspezifische T-Zellen zu induzieren [6-8], werden seit den neunziger Jahren in experimentellen klinischen Studien dendritische Zellen zur Immuntherapie bei onkologischen Erkrankungen verwendet. Bei vier Patienten mit einem follikulären B-Zell Lymphom konnte man zum Beispiel erste Erfolge mit Antigen-beladenen DCs nachweisen. Alle Patienten zeigten messbare immunologische Antitumor-Reaktionen. Ein Patient zeigte eine komplette Remission, ein anderer zeigte eine partielle

Tumorregression. Einem weiteren Patienten konnte man keinerlei Tumorlast mehr mittels sensitiver tumorspezifischer Verfahren nachweisen [9].

Anhand von Mausmodellen konnte man zeigen, dass dendritische Zellen in der Lage sind, Tumorantigene von lebenden oder sterbenden Tumorzellen zu phagozytieren und diese an T-Zellen in tumorrelevanten Lymphknoten zu präsentieren. Dies führt zu einer Heranreifung von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen, die zur Tumorbekämpfung beitragen können [4].

Diese Mechanismen bieten die Rahmenbedingungen für ein enormes therapeutisches Potenzial und zeigen auf, wie wichtig die momentane Forschung auf diesem Gebiet ist. In den vergangenen Jahren gab es für den klinischen Einsatz von DCs verschiedene Ansätze, wobei die meisten therapeutische Erfolge aufweisen konnten. Unter anderem wurden DCs ex vivo mit Tumorzell-Lysaten oder apoptotischen Zellkörpern beladen, um dann wiederum im Patienten eine T-Zellantwort hervorzurufen. Darüber hinaus wurden DCs auch ex vivo mit tumorspezifischen Antigenen oder tumorspezifischer mRNA getriggert, um über den oben beschriebenen Mechanismus eine ähnliche Immunantwort hervorzurufen [2].

Ex vivo hergestellte autologe DCs in ausreichender Zahl und Qualität sind von großer Bedeutung und für den Erfolg derartiger Therapieansätze ausschlaggebend.

2.3. Dendritische Zellen im klinischen Einsatz

Das Ziel der Immunologen ist es eine tumorspezifische CD8⁺ T-Zell Immunantwort auszulösen. Diese sollte zu einer Tumorregression oder im Bestfall zu einer kompletten Tumoreradikation führen. Diese Theorien werden durch klinische Studien gestützt, die unter anderem auf die Produktion von E-Cadherin verweisen, das in der Zelllyse eine entscheidende Rolle spielt [10]. In zahlreichen Studien konnte der Einsatz dendritischer Zellen in der Onkologie Erfolge aufweisen.

Die ersten Erfolge zeigten sich bei der Bekämpfung des Prostatakarzinoms. Da das metastasierte Prostatakarzinom als nicht kurabel galt, fand die Vakzinierung von DCs

durch Prostata-spezifische Membran Antigene (Abk.: PSM-P2, engl.: prostate-specific membrane antigens) große Beachtung, da es in dieser Testgruppe zu Erniedrigungen der prostataspezifischen Antigen (Abk.: PSA) Konzentrationen kam [11]. Bei einem neuroendokrinen Pankreaskarzinom konnte man nach 9-monatiger Immuntherapie mit DCs neben einer deutlichen Regression, auch eine Abnahme der Tumormarkerkonzentration (Chromogranin A) beobachten [12]. Ebenso konnten erstaunliche Therapieerfolge durch Vakzinierungen beim malignen Melanom erzielt werden. Die Überlebenszeit bei Stadium IV Melanomen, konnte mittels der allogenen vakzinieren DCs (Colo829 Melanom Zelllinie), verlängert werden (im Mittel 22.5 Monate mit einer Streuung von 2 - 35.5 Monaten). Selbst eine komplette Regression wurde beobachtet [13]. Derzeit wird vermutet, dass in vivo gewonnene DCs (direkt aus dem peripheren Blut) immunogener im Vergleich zu ex vivo generierten DCs (aus Monozyten herangereift) sind. Insbesondere zeigten „in vivo DCs“ einen Vorteil bezüglich des Outcomes für den Einsatz bei dem Malignen Melanom im Vergleich zu den ex vivo generierten DCs. Allerdings ist die Anzahl der DCs, die direkt aus dem peripheren Blut gewonnen werden deutlich geringer [14, 15].

Auch bei dem Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom (Abk.: NSCLC) konnte man Erfolge verzeichnen. In einer Meta-Analyse verglich man den Einsatz von konventioneller Chemotherapie kombiniert mit dem Einsatz von DCs mit dem ausschließlichen Einsatz von Chemotherapie. Die kombiniert behandelten Patienten hatten im ersten Jahr eine höheres overall survival (9%). Das progressionsfreie Überleben (PFS) war ebenfalls verlängert, dieser Vorteil bestand allerdings nicht im zweiten Jahr [16].

Auf diversen onkologischen Gebieten also findet die Immuntherapie mittels DCs zunehmende Anwendung. Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist ihr Einsatz zur Eradikation der MRD in der AML. Nach erfolgreicher DC Generierung, ist es das Ziel die DCs mittels Elektroporation mit antigenkodierender mRNA (WT1, PRAME und hCMVpp65) zu beladen. Im Anschluss sind die beladenen DCs zur TH1-Zellinteraktion und zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten, sowie NK Zellaktivierung befähigt [17]. Der klinische Nutzen ist schon mehrfach untersucht und bestätigt worden. Mehrere Patienten konnten,

nach Gabe der Induktions- und Konsolidierungstherapie, von der Therapie mit DCs – bis hin zur kompletten Remission - profitieren [18].

Lichtenegger und Mitarbeiter veröffentlichten kürzlich einen Überblick neuer Ansätze zur Immuntherapie bei AML [19].

Es gibt vier neue Ansätze:

1. Mit Toxinen konjugierte Antikörper
2. Rekrutierung von bispezifischen T-Zellen (engl.: bispecific T-Cell engaging antibodies)
3. T-Zellen, in die Rezeptoren für leukämiespezifische Antigene transfiziert wurden (CAR T-Cells)
4. Dendritische Zellen für Vakzinierungsstudien

Im Rahmen einer klinischen Patientenstudie der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. med Subklewe sollen insgesamt 20 Patienten (6 in Phase 1, 14 in Phase 2) mit AML in Remission mit autologen DCs behandelt werden. Für diese Studie ist es von Bedeutung, dass die DCs in einem optimalen Reifungszustand sind. Ziele der Studie sind die Umsetzbarkeit und Sicherheit der aktiven Immuntherapie mit autologen DCs. Außerdem sollen Immunantworten generiert, die MRD kontrolliert und die Zeit bis zur Progression der Erkrankung (engl.: time to progression, Abk.: TTP) verlängert werden.

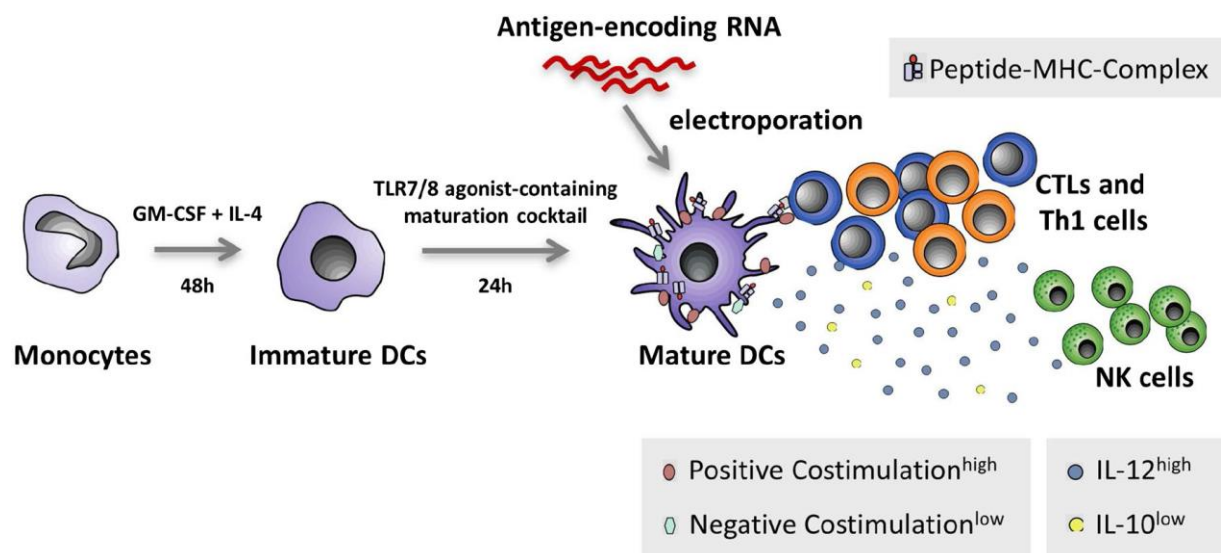


Abb. 1.2.: Schema: Dendritische Zellen von der Reifung bis zum klinischen Einsatz [17]

2.4. Akute Myeloische Leukämie

Die AML ist die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter. Besonders bei älteren Patienten hat sie eine schlechte Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur etwa 24,2% (2003-2009; SEER). Es gelingt zwar bei 60-80% aller Patienten unter 60 Jahren nach Polychemotherapie eine komplette Remission (Abk.: CR) zu erreichen [20], allerdings erfährt der Großteil ein Rezidiv, wofür die MRD verantwortlich ist. Eine Ausnahme stellt die Akute Promyelozyten Leukämie (APML; M3) dar, die auf Grund ihres ausgesprochen guten therapeutischen Ansprechens unter anderem gegenüber all-trans Retinsäure (ATRA) einzigartig ist und im Gegensatz zu den anderen AML-Subgruppen hohe langfristige Heilungsraten aufweist [21]. Derzeitige Behandlungsstrategien orientieren sich an verschiedenen Parametern: Zytogenetische Charakteristika der AML, molekulare Genetik, Alter des Patienten, initiale Blastenlast, Blasten Clearance und Allgemeinzustand des Patienten fließen bei der Entscheidung für die Therapie mit ein. Da das Erreichen einer CR nicht mehr das Hauptproblem darstellt, ist die Eradizierung der MRD Gegenstand intensiver Forschung, um die Prognose der AML entscheidend zu verbessern. In den vergangenen Jahren wurden einige Therapieansätze entwickelt, um die MRD zu eliminieren und somit den Rezidiven vorzubeugen - dies allerdings mit begrenztem Erfolg. Neben der allogenen und autologen hämatopoetischen Stammzelltransplantation werden auch Protokolle mit Cytarabin oder IL-2 in Kombination mit Histamin-Dichloride verwendet [22]. Falls ein passender Spender gefunden wurde, ist die Stammzelltransplantation momentan die einzige kurative Option. Allerdings birgt die Stammzelltransplantation, ein erhöhtes Komplikationspotenzial. Hier wären die Graft-versus-Host-Reaktion und Infektionen (z.B. mit CMV) als die Hauptkomplikationen zu nennen [23, 24]. In letzter Zeit gab es mehrere neue immunologische Therapieansätze. Erfolgsversprechende Ergebnisse zeigten Vakzinierungen mit Leukämie-spezifischen Antigenen (u.a. Wilm's tumor gene product 1, Abk.: WT-1) bei AML- und MDS-Patienten [25].

Im Rahmen einer aktiven Vakzinierung mit WT-1-RNA-transfizierten autologen DCs konnte man immunogene und anti-leukämische Aktivität nachweisen. Insbesondere korrelierte das Erreichen einer klinischen oder molekularen Remission mit der Vermehrung CD8 positiver tumorspezifischen T-Zellen und einer starken Vermehrung von NK-Zellen [18].

2.5. Generierung dendritischer Zellen

In den letzten Jahren wurden verschiedenste Ansätze für die Züchtung von DCs entwickelt. Anfänglich wurden 10-tägige Protokolle erstellt. Inzwischen hat sich herausgestellt, dass Protokolle über 24-48 Stunden ausreichend sind [26]. Für die Maturierung haben sich die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE2 als besonders effektiv herausgestellt [27]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Hinzufügen von IFN- γ und die TLR Liganden polyI:C und R848 bei den DCs eine erhöhte Sekretion von dem Zytokin IL-12p70 hervorbringen, welches eine tragende Rolle bei der Aktivierung von T1-Helferzellen (TH1-Zellen) und NK-T-Zellen spielt [28, 29].

Dementsprechend hat die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. med. Subklewe ein 3-Tages-Protokoll zur Generierung von reifen und funktionstüchtigen DCs aus Monozyten unter der Zugabe von entsprechenden Zytokinen und TLR-Agonisten entwickelt, welches auch die Grundlage für diese Dissertation bildet [28].

2.6. Fragestellung

Bei der Optimierung dieser Protokolle im Sinne der Guten Herstellungspraxis (engl.: Good Manufacturing Practice, Abk.: GMP) unter Verwendung verschiedener Reifungsansätze sind wir auf phenotypische, qualitative und quantitative Unterschiede von DCs gestoßen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Ansätze überprüft und die DCs auf verschiedene funktionelle Eigenschaften untersucht. Während der Generierung der DCs wurde Very Low Endotoxin-RPMI (VLE-RPMI, Biochrom, Berlin) verwendet, welches entweder durch 1,5% gepooltem Humanserum (Abk.: PHS, Institut für Transfusionsmedizin Suhl, Deutschland), autologem Humanserum (Abk.: AHS) von gesunden Spendern oder AHS von AML Patienten ergänzt wurde. Für die GMP wäre eine Züchtung von DCs unter autologen Bedingungen von Vorteil. Sicherlich würde ein ausschließlich autologes System im

Vergleich zu gepooltem Serum, das von einer Vielzahl von Spendern stammt, die Sicherheitsrisiken bezüglich möglicher Infektionen (viral, bakteriell etc.) minimieren. Hier wurden auch die autologen Seren von an AML erkrankten Spendern zur Generierung der DCs untersucht. Uns hat insbesondere die Frage interessiert, ob Serum von AML Patienten immunsupprimierende Wirkung auf die DC Generierung hat. Das Ergebnis ist hochrelevant für die komplett autologe GMP-Produktion von DC und könnte zusätzlich ein Hinweis auf eine mögliche Immunsuppression bei AML Patienten *in vivo* geben.

Nachdem die DCs geerntet wurden, sind diese auf Zellzahl und Viabilität geprüft worden. Außerdem wurde der Phänotyp analysiert. Um funktionelle Unterschiede festzustellen, wurden darüber hinaus ein Migrations Assay und ein Signal-3-Assay durchgeführt.

3. Methoden, Probanden und Patienten

3.1. Zellgewinnung

Nach schriftlicher Einwilligung der Patienten entsprechend der Deklaration von Helsinki und der ethischen Richtlinien der Ludwig-Maximilian-Universität (München, Deutschland) wurden Vollblutproben von 3 AML-Patienten und 14 gesunden Probanden, sowie Serumproben von 6 AML-Patienten entnommen. Die Patienten spendeten ihre Proben jeweils entweder direkt nach der Erstdiagnose vor der Konsolidierungstherapie oder vor Beginn einer Erhaltungstherapie, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.2. Isolierung von PBMCs

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) wurden wie folgt isoliert:

Zuerst wurde das heparinisierte Blut mit PBS (Biochrome, Berlin, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Anschließend haben wir 12 ml Ficoll (Biochrom, Berlin, Deutschland) in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und diese dann mit je 25 ml Blut-PBS-Gemisch vorsichtig und langsam überschichtet, so dass die Grenzschicht stabil

geblieben ist. Daraufhin wurde das heterogene Gemisch bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert (30 Minuten, 2000 Umdrehungen pro Minute, Raumtemperatur). Nun haben sich in der Grenzschicht zwischen Ficoll und Plasmaüberstand, die PBMCs in einer weißlich-grauen Schicht gesammelt. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Ficoll ein ungeladenes Sucrose-Polymer ist, dessen Dichte (1,077g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate, Granulozyten und Zellen höherer Dichte die Ficollschicht passieren können, während sich PBMCs in der Zwischenphase ansammeln. Im nächsten Schritt wurden diese Zellen behutsam mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde nun auf 50 ml kaltem und sterilem RPMI (Biochrom, Berlin, Deutschland) aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 1800 Umdrehungen pro Minute, 4 °C). Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet in kaltem Medium resuspendiert.

3.3. Züchtung von reifen DCs

Nach der Isolierung der PBMCs wurden $1-2 \times 10^7$ Zellen in je 3 ml VLE-RPMI (=Very Low Endotoxine – RPMI, Biochrome, Berlin, Deutschland) auf 6-Well Platten ausplattiert. Es wurde je nach Ansatz anteilig 1,5 % gepooltes Humanserum (PHS = Pooled Human Serum) oder autologes, dem Zellspender entnommenes Serum (AHS = Autologous Human Serum) hinzugegeben. Zur Monozytenadhärenz wurde die Platte nun für 90 Minuten zur Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank gelagert. Anschließend kam es zu einem Waschvorgang, um die nicht-adhärenenten Zellen (NAZ) zu entfernen. Hierfür wurde zunächst das Medium abpipettiert und zweimal mit 2 ml PBS pro Well die restlichen NAZ durch vorsichtiges auf- und abpipettieren entfernt. Als nächstes haben wir erneut 3 ml VLE-RPMI pro Well unter Zugabe von 2 µl/ml der Zytokine GM-CSF (=Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und IL-4 (=Interleukin 4, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Erneut haben wir die Zellen unter gleichen Bedingungen für 48 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und eingefroren (für die Messung von IL-12 und IL-10 mittels ELISA). Danach wurde ein Maturationscocktail bestehend aus verschiedenen Zytokinen in frisches VLE-RPMI Medium gegeben [TNF-α 1 µl/ml (=Tumor-Nekrose-Faktor, R&D Systems, Minneapolis,

USA), IL-1 β 1 μ l/ml (=Interleukin-1 β , R&D Systems, Minneapolis, USA), IFN- γ 1,25 μ l/ml (=Interferon- γ , R&D Systems, Minneapolis, USA), R848 1 μ l/ml (= Resiquimod, Invivogen, San Diego, USA), PGE₂ 0,25 μ l/ml (= Prostaglandin E₂, Sigma, St. Louis, USA), GM-CSF 2 μ l/ml, IL-4 2 μ l/ml]. Es folgte wiederholt eine 24-stündige Inkubation unter gleichen Bedingungen. Abschließend wurden die reifen DCs durch zweimaliges gründliches Waschen der Platten mit VLE-RPMI geerntet und in Zentrifugenröhrchen überführt.

(Vereinfachung: DCs mit der Zugabe von gepooltem Humanserum generiert, in der Folge als **PHS-DCs** abgekürzt bzw. DCs mit der Zugabe von autologem Spenderserum generiert, in der Folge als **AHS-DCs** abgekürzt)

3.4. Zellzählung, Zellviabilität und Recovery

Nach der Zellernte wurde die Zellzahl bestimmt. Neben der manuellen, mikroskopischen Zellzählung mittels der Neubauer Zählkammer wurde auch ein automatisierter Zellzähler (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Dieser wurde auch für die Bestimmung der Viabilität (prozentualer Anteil an lebenden, vitalen Zellen an der Gesamtpopulation) der Zellen verwendet. Durch die gezählte Zellzahl konnte man auch die Recovery errechnen (prozentueller Ertrag der Ernte, geerntete DCs/ausgesäte Zellen).

3.5. Durchflußzytometrie und Phenotyp-Analyse

3.5.1. Prinzip der Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht einerseits auf den Lichtstreuungseigenschaften der einzelnen Zellen und andererseits auf der Messung von fluoreszierendem Licht, welche die Zellen entweder selbst oder nach speziellen Färbungen emittieren. Der Laserstrahl eines Durchflußzytometers erfasst die einzelnen Zellen und der Detektor misst das Streulicht. So unterscheidet man das Vorwärtstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) und das Seitwärtstreulicht (SSC = *Side Scatter*), die Maße für das Volumen bzw. die Granularität einer Zelle darstellen. Zur Messung der Fluoreszenzemission, werden

Farbstoffe verwendet, die die Zellen an ihren Bestandteilen binden können. So binden manche Farbstoffe an die DNA (z.B. Propidiumiodid interkalierend), andere - so wie in dieser Arbeit verwendet - sind an Antikörper gekoppelt und binden an die Oberflächenproteine (CD = Cluster of Differentiation) der Zellen. Durch die Sortierung der Zellen nach der Expression der vorkommenden Oberflächenproteine lassen sich einzelne Populationen und deren Eigenschaften noch differenzierter sortieren und analysieren.

3.5.2. Phänotypanalyse mittels FACS Calibur

Für die Durchflusszytometrie wurde das FACS Calibur System der Firma BD Biosciences verwendet (FACS = fluorescence-activated cell sorting).

Zunächst wurden die restlichen dendritischen Zellen in gleicher Anzahl auf verschiedene FACS-Röhrchen verteilt. Dann folgte der erste Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer (500 ml PBS + 2,5 ml BSA + 2 ml EDTA) je Röhrchen mit anschließender Zentrifugation (500 g, 5 min). Der Restpuffer wurde nun resuspendiert und mit je 10 µl FcR-Block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), zur Blockierung des Fc-Rezeptors versetzt und für 10 Minuten bei 4 °C gelagert. Im Anschluss wurde der erste Waschvorgang wiederholt. Je nach Zellzahl wurden nun etwa 50-200 µl FACS Puffer hinzugegeben. Daraufhin wurden die Antikörper und Isotypkontrollen [Kontrolle durch unspezifische Bindung von Primärantikörpern mittels APC (=Allophycocyanin, Biolegend, San Diego, USA), FITC (=Fluorescein isothiocyanate, Biolegend, San Diego, USA) und PE (=Phycoerythrin, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)] in entsprechender Menge (Je Röhrchen: Isotypenkontrolle mit FITC - 1µl, mit PE - 1µl und mit APC - 0,5µl; Oberflächenmarker: CD14 FITC - 4µl, CD83 PE - 20µl, CD86 FITC - 4µl, CD274 FITC - 4 µl, CCR7 APC - 3µl, CD206 FITC – 4µl) appliziert und für 15 Minuten bei 4 C° inkubiert. Erneut wurde der Waschschrift wiederholt. Abschließend wurden 200 µl FACS Fix (Zellfixierung mittels Formaldehyd) hinzugegeben. Nun konnte man die fixierten Zellen durch das FACS Calibur System laufen lassen und sie anhand ihrer Morphologie analysieren.

3.6. Signal 3 Assay

Die CD8⁺ T-Zellen von Säugetieren werden von Antigenen aktiviert (Signal 1) und vom Oberflächenantigen CD28 kostimuliert (Signal 2). Somit wird die Zellteilung in Gang gebracht. Um aber ihr Überleben, ihre Effektor- und Gedächtnifunktionen zu gewährleisten, benötigen sie unter anderem die Stimulation durch Zytokine (Signal 3), wie IL-12 und Interferone (INF-alpha/beta) [30].

In diesem Assay wurden die reifen DCs in Kokultur mit CD40L Fibroblasten (CD154 Fibroblasten, Mausfibroblasten, zur Verfügung gestellt von A. Moosmann, Helmholtzinstitut, München) gebracht. Dies hatte den Zweck, die Interaktion von reifen DCs mit aktivierten T-Zellen, welche auch CD40L exprimieren, zu simulieren.

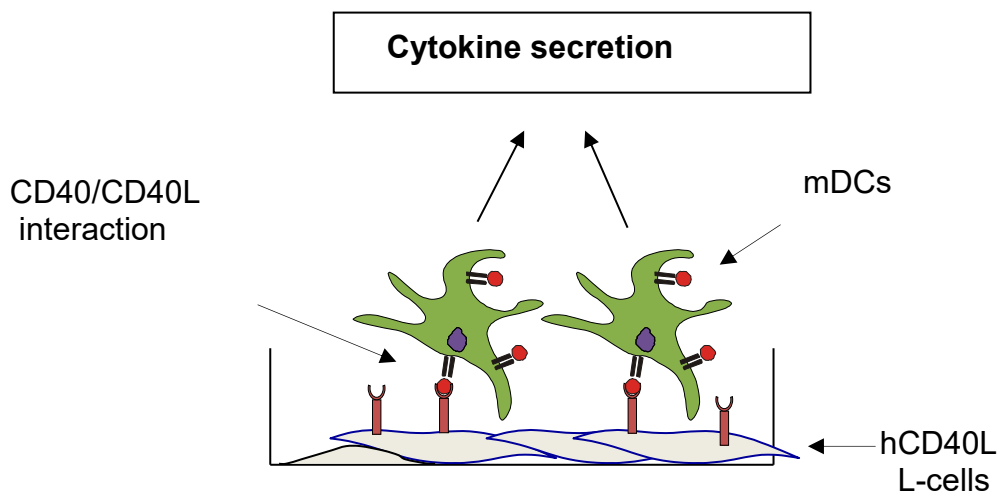


Abb. 2.1.: Interaktion von DCs mit CD154 Fibroblasten zur Stimulation der IL-12 Sekretion
[Quelle: Posterpräsentation Herrsching, 2013]

Im Anschluss wurden die IL-10 und IL-12 Spiegel mittels ELISA ermittelt. Die Fibroblasten wurden mindestens eine Woche vor Gebrauch in Kultur genommen und ihre CD154 (CD40L) Expression wurde regelmäßig durch FACS kontrolliert. Um die adhärennten Fibroblasten abzulösen, wurde in die Zellkultur nach einmaligen Waschen mit 10 ml PBS und 3 ml Trypsin-EDTA (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA) hinzugegeben und 5 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die restlichen

Fibroblasten durch vorsichtiges Klopfen gegen den Rand der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen / 100 μ l VLE-RPMI mit entweder 1,5 % PHS oder 1,5 % AHS resuspendiert. Auf einer 96-Well Flachbodenplatte wurden 48 Wells mit jeweils 100 μ l CD40L Fibroblasten haltigem Medium (24 Wells mit 1,5 % PHS und 24 Wells mit 1,5% AHS) ausgesät. Die andere Hälfte (48 Wells) der Platte wurde zur Kontrolle mit 100 μ l reinem VLE-RPMI und 1,5 % PHS bzw. 1,5 % AHS je Well gefüllt. Zum erneuten Adhärenzieren der Fibroblasten, wurde die 96-Well Platte bei oben genannten Bedingungen für mindestens zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die übrigen geernteten DCs wurden in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen / 100 μ l mit VLE-RPMI und 1,5 % PHS bzw. 1,5 % AHS versetzt. Nach Ende der Inkubation der Fibroblasten wurden 100 μ l des DC-haltigen Mediums auf je mindestens 3 Wells (Triplikate) zugegeben. Dementsprechend wurden also mindestens 6 Wells (mind. 3 Wells mit VLE-RPMI + **PHS** und 3 Wells mit VLE-RPMI + **AHS**) in denen sich adhärenzierte Fibroblasten befanden, mit je 100 μ l DC-haltigem VLE-RPMI und entsprechend 1,5 % **PHS** bzw. 1,5 % **AHS** kombiniert. Zur Kontrolle wurden jeweils mindestens Tripletten an PHS-DCs bzw. AHS-DCs in Medium ohne Fibroblasten gegeben. Folglich wurden auch Fibroblasten mit reinem VLE-RPMI (mit 1,5% PHS bzw. 1,5% AHS) ohne die Zugabe von DCs versetzt.

Am nächsten Tag haben wir die Platte 5 Minuten lang (Beschleunigung: 9, Bremse: 9, 550g) zentrifugiert. Dies diente der Trennung der zellulären (DCs) von den löslichen Bestandteilen (messbare Zytokine, IL-12 und IL-10). Der Überstand der einzelnen Ansätze wurde jeweils in eine neue 96-Well Platte in gleicher Anordnung übertragen und der beschriftete Deckel der alten Platte wurde erneut passend für die neue Platte verwendet. Zuletzt wurde die Platte luftdicht verpackt und bei -20 °C eingefroren. Aufgetaut wurden jene Platten wieder bei der gemeinsamen Bestimmung mehrerer Ansätze von den Zytokinen IL-10 und IL-12 mittels ELISA.

3.7. IL-10/-12 ELISA

3.7.1. Erläuterung zu IL-10 und IL-12

Die Zytokine IL-10 und IL-12 verhalten sich aus immunologischen Gesichtspunkten konträr. IL-10 einerseits wirkt dabei im Allgemeinen inhibitorisch. Es wirkt auf die Antigen präsentierenden Zellen (auch APCs genannt) - also auch auf die DCs selbst – und hemmt dabei über unterschiedliche molekulare Wege die Interaktion zwischen DC und TH1 Zellen. TH1 Klone wiederum produzieren so deutlich weniger immunstimulierende Zytokine (z.B. INF- γ) [31]. Auf der anderen Seite spielt IL-12, als heterodimeres proinflammatorisches Zytokin, eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Differenzierung der TH1-Zellen. Die INF- γ Produktion der TH1-Zellen hängt in großem Maße von der Stimulation durch IL-12 ab, welches hauptsächlich von DCs produziert wird. Darüber hinaus bildet es eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem [32].

3.7.2 Durchführung des IL-10/12 ELISA

Nachdem wir im vorherigen Assay Überstände von DCs in Kokultur mit CD40L Fibroblasten gewonnen haben, wurden nun die Konzentrationen von den Zytokinen IL-12 und IL-10 gemessen, um funktionelle Eigenschaften der DCs darzustellen. Am Tag vor der Durchführung wurden die ELISA Platten mit Capture Antikörper (R&D ELISA Kit, Minneapolis, USA) benetzt. Hierfür wurden 10 ml PBS mit 56 μ L des besagten Antikörpers in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach sofortigem Vortex wurden 100 μ L des Gemisches pro Well auf die Platte gegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Außerdem wurde am Vortag ausreichend Waschpuffer, bestehend aus 100 mL PBS (10X), 900 mL Millipore Wasser und 500 μ L Tween20 (Sigma, St. Louis, USA), hergestellt. Am Tag des Assays wurden alle Reagenzien und Proben vorsichtig auf Raumtemperatur erwärmt und die Waschanlage wurde mit dem Waschpuffer gefüllt. Anschließend wurde die ELISA Platte dreimal mit 300 μ L Waschpuffer gewaschen und dann mit 300 μ L Reagent Diluent (PHS-VLE-RPMI bzw. AHS-VLE-RPMI mit 1% BSA) pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der

Zwischenzeit wurde der Standard mit PHS-VLE-RPMI bzw. AHS-VLE-RPMI (VLE-RPMI versetzt mit 1,5% PHS bzw. 1,5% AHS) entsprechend der Herstellerangaben verdünnt [IL-12: 5µL und 575 µL Reagent Diluent (=2000 pg/ml); IL-10: 3µL und 630 µL Reagent Diluent (=1000pg/ml)]. Erneut wurde der Waschschrift durchgeführt und je nach Anordnung 100 µL Standard bzw. 100 µL Probe [Überstände aus dem Signal 3 Assay (Verdünnung 1:1 und 1:10)] und DCsup [DC Supernatant = Überstand nach DC Maturierung aus der DC Generation (Verdünnung 1:10 und 1:100)] auf die Wells verteilt. Die ELISA Platte wurde erneut mit einer Klebefolie verschlossen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf wurde der oben genannte Waschvorgang erneut wiederholt. Nun wurde eine Lösung von 56 µl der Detection Antikörper in 10 ml Reagent Diluent gelöst und nach gründlichem Vortex unmittelbar 100 µl in jedes Well gegeben. Darauf wurde ein Waschschrift durchgeführt. Es folgte die Zugabe von Streptavidin-HRP (=Konjugat, je Platte: 50 µl S-HRP + 10 ml Reagent Diluent), die Applizierung einer Klebefolie und eine 20 minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, sowie im Anschluss ein erneuter Waschschrift. Final wurden 100 µl Substratlösung pro Well pipettiert und die 20 minütige Dunkelinkubation bei Raumtemperatur wiederholt. Daraufhin wurde der Reaktionsprozess mit H₂SO₄ (Stop Lösung) abgebrochen. Binnen 30 Minuten wurde die Fluoreszenz (optische Extinktion) am Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm abgemessen und anhand der Standardreihe ausgewertet.

3.8. Migrations Assay

3.8.1. Prinzip

Dieser funktionelle Test dient zur Prüfung der Migrationsfähigkeit der reifen DCs. Er simuliert die Wanderung der dendritischen Zellen vom Ort der Antigenaufnahme zu den Lymphknoten, um dort mit den Lymphozyten zu interagieren. Diese Migration wird bestimmt durch spezifische Oberflächenmoleküle der reifen DCs in Form von CCR7 und sogenannter Chemokine (in diesem Assay CCL19 = MIP-3β, R&D Systems, Minneapolis, USA). Letztere bestimmen die Migrationsrichtung, indem sie einen Gradienten aufbauen.

Die Transwell-Migrationsassays werden unter der Verwendung von 96-Well Mikrotiterplatten (Corning, New York, USA) durchgeführt, deren je zwei Kompartimente durch eine Membran getrennt werden. Die Poren der Membran (5µm) können durch ihre

Größe nur von Zellen passiert werden, die gerichtet wandern. Hierzu wird in das untere Kompartiment das Chemokin und in das obere Kompartiment (auf die Membran) die definierte Zellzahl der DCs gegeben. Nach der Inkubationszeit werden anschließend die vom oberen in das untere Kompartiment gewanderten Zellen ausgezählt. Dies geschieht mittels Celltiter Glo (Promega, Madison, USA) welches luminometrisch in den Zellen vorkommendes ATP nachweist. Als Kontrollen werden Wells ohne dem Chemokin CCL19 gewählt.

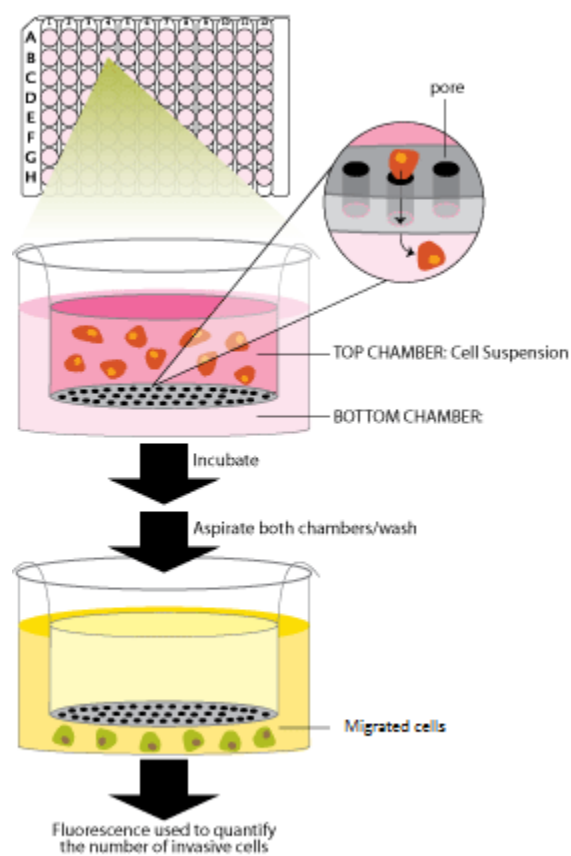


Abb. 2.2.: Schematischer Ablauf eines Migrationsassays [Modifiziert nach Firmenbroschüre, RND systems]

3.8.2. Durchführung des Migrationsassays

Zu Beginn wurden die oberen Kompartimente mit 50 µl entsprechendem Medium bespickt und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wieder abgekippt. Währenddessen wurde eine Suspension hergestellt, die in 80 µl 5×10^4 DCs enthielt. Diese waren jeweils für die Wells der oberen Kompartimente vorgesehen. Für die unteren Kompartimente waren 150 µl entsprechendes Medium je Well vorgesehen, die 25 ng/ml des Chemokins CCL19 enthielten. Darüber hinaus wurden auch Kontrollen ohne Zugabe von CCL19 angesetzt. Nun wurden in die oberen Kompartimente der Wells 80 µl mit 5×10^4 DCs gegeben (je nach Zellzahl Duplikate oder Triplikate). Diese oberen Kompartimente wurden anschließend in die unteren Kompartimente der Mikrotiterplatte (MTP) gelegt. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 37 °C. Nach Entnahme der Platte aus dem Inkubator wurden je 100 µl aus den unteren und je 50 µl aus den oberen Kompartimenten entnommen und in eine 96-Well-MTP überführt, die durch ihre Transparenz für die Lumineszenzmessung geeignet ist. Danach wurden 100 µl CellTiter Glo-Reagenz in jedes Well zugegeben. Dieses dient als Indikator für die Messung von ATP, welches durch Zelllyse freigesetzt wird. Durch die luminometrische Bestimmung von ATP wurden zuletzt die relativen Zellzahlen bestimmt.

3.9. Statistische Auswertungen

Bei der Analyse von Zellzahl, Viabilität, Recovery und ELISA wurde ein gepaarter t-Test angewendet. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ festgelegt. Die Migrationsfähigkeit wurde mittels des ratio paired t-Test analysiert. Auch hier ging man bei einem p-Wert $< 0,05$ von signifikanten Werten aus.

3.10. Probanden und Patienten

Nach schriftlicher Einwilligung der Patienten entsprechend der Deklaration von Helsinki und entsprechend der ethischen Richtlinien der Ludwig-Maximilian-Universität (München, Deutschland) wurden insgesamt PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von 3 AML Patienten und 14 gesunden Spendern entnommen. Außerdem wurden Seren von 6 AML Patienten und 14 gesunden Spendern gewonnen. Dies erfolgte nach schriftlicher Einwilligung aller Spender.

4. Ergebnisse

4.1. Zellzahl und Recovery

Für eine erfolgreiche Immuntherapie ist eine suffiziente Zellzahl immunologisch aktiver DCs erforderlich. Deshalb ist die erste und wichtigste Frage, wie diese Zellen am effektivsten gewonnen werden können. Deshalb untersuchten wir die Ausbeute unter verschiedenen Kulturbedingungen (siehe Abb. 3.1, 3.2 und 3.3).

Unter den unterschiedlichen Bedingungen konnten wir signifikante Unterschiede bei der Zellzahl und daraus folgend bezüglich der Recovery nach Durchführung des 3-Tages Protokolls zur Generierung dendritischer Zellen feststellen. Die Recovery ist folgenderweise definiert:

(Geerntete DCs/ausgesäte PBMCs)x100. Sie spiegelt den Ertrag an DCs in Prozent wieder.

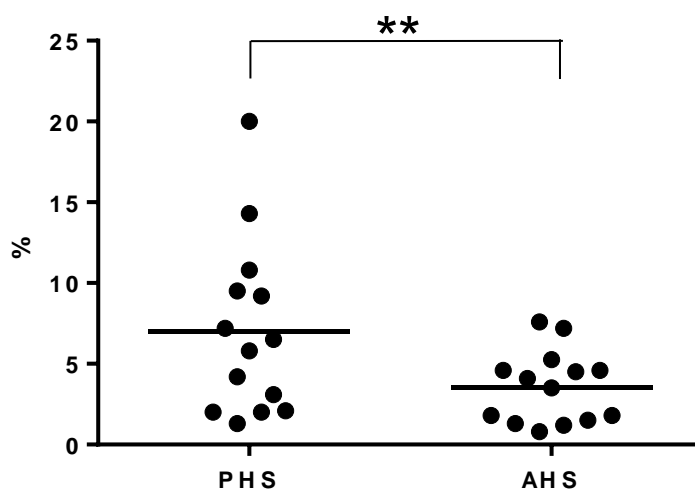


Abb. 3.1: DC Recovery gesunder Probanden. DCs gewonnen aus 14 gesunden Probanden und generiert in Medium mit PHS oder AHS nach dem Schema des 3-Tages DC Protokolls. Die Recovery von AHS-DCs mit $3,7\% \pm 2,2\%$, war signifikant geringer als die der PHS-DCs (Recovery: $7,0\% \pm 5,4\%$; $p=0,006$).

Die Recovery von DCs, die aus AML Patienten entnommen wurden zeigte eine ähnliche Tendenz.

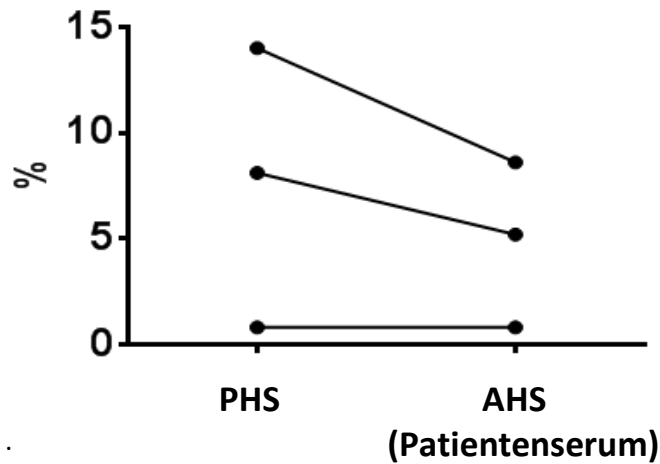


Abb. 3.2: DC Recovery von AML Patienten. Die Ernte der AHS-DCs, gewonnen von 3 AML Patienten tendierte im Vergleich zu PHS-DCs zu einer geringeren Ausbeute.

Des Weiteren haben wir die Generation von DCs gesunder Spender in einem Medium mit ihrem eigenen Serum (AHS) und AML Patientensera anhand ihrer Recovery verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

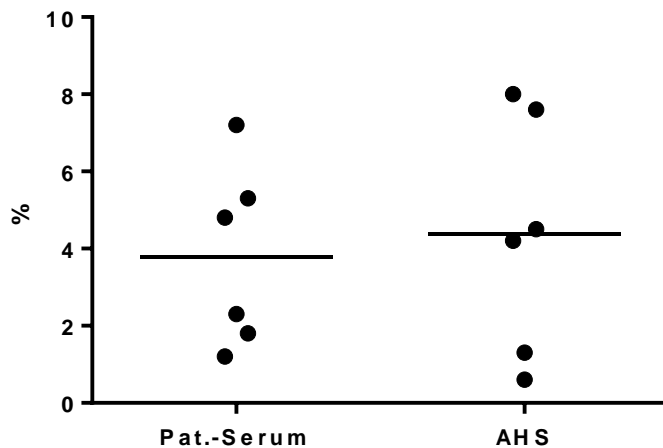


Abb. 3.3: DC Recovery gesunder Probanden. Die Ernte von AHS-DCs, gewonnen aus gesunden Probanden zeigte im Vergleich zu DCs, die in einem Medium **mit AML Patientensera** generiert wurden, keinen signifikanten Unterschied [DCs + AML Patientensera: 3,77 % \pm 2,66 % vs. AHS-DCs (Serum gesunder Probanden): 4,37 % \pm 3,01 %; ns, p= 0,37]

4.2. Viabilität

Eine wichtige Bedingung für eine aktive Immuntherapie ist eine ausreichende Vitalität der DCs. Unsere Ergebnisse sind in Abb. 4.1, 4.2, und 4.3 dargestellt.

Bei der Viabilität der geernteten DCs zeigten sich auch signifikante Unterschiede unter den unterschiedlichen Bedingungen. Die PHS-DCs waren im Vergleich zu den AHS-DCs im Bezug auf ihre Viabilität signifikant überlegen.

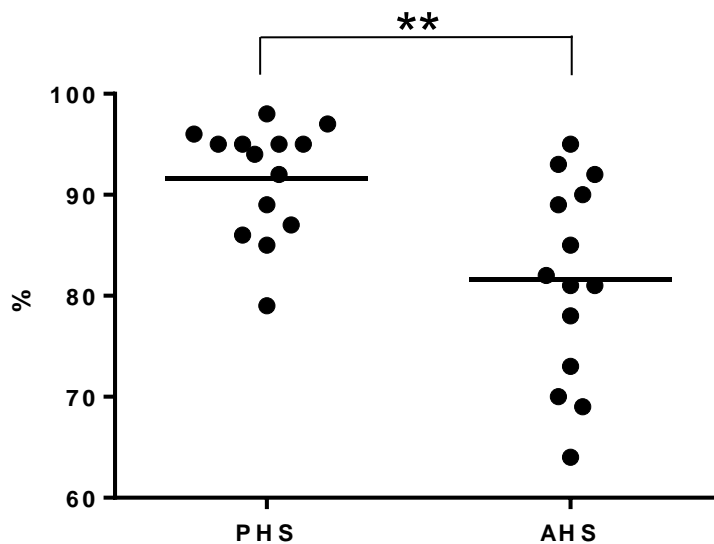


Abb. 4.1: DC Viabilität gesunder Probanden. DCs gewonnen aus 14 gesunden Probanden und generiert in Medium mit PHS oder AHS nach dem Schema des 3-Tages DC Protokolls. Die Viabilität von AHS-DCs mit $82\% \pm 9,8\%$, war signifikant geringer als die der PHS-DCs (Viabilität: $92\% \pm 5,6\%$; $p=0,003$).

Auch die Viabilität der DCs, die aus AML Patienten gewonnen wurden zeigten Unterschiede. Hier war die Viabilität der AHS-DCs erneut unterlegen.

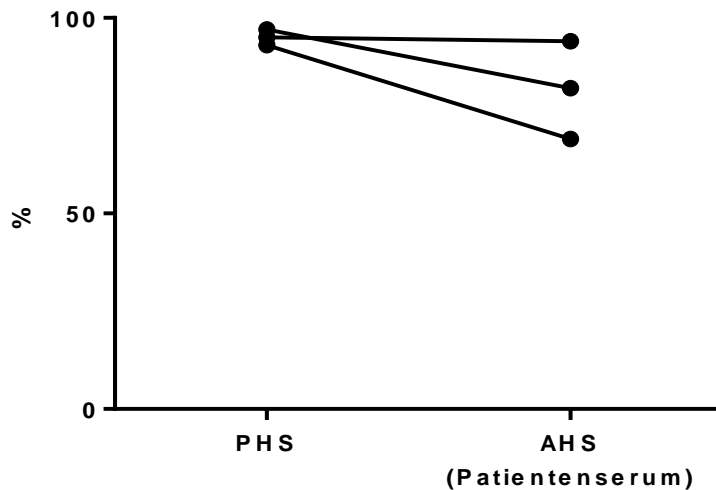


Abb. 4.2: DC Viabilität von AML Patienten. Die AHS-DCs ($82\% \pm 10,2\%$), gewonnen von AML Patienten tendierte im Vergleich zu PHS-DCs ($92\% \pm 1,6\%$) zu einer geringeren Viabilität.

Schließlich haben wir erneut die Züchtung von DCs gesunder Spender in einem Medium mit ihrem eigenen Serum (AHS) und AML Patientenserum, anhand ihrer Viabilität verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, mit einem leichten Vorteil für die AHS-DCs.

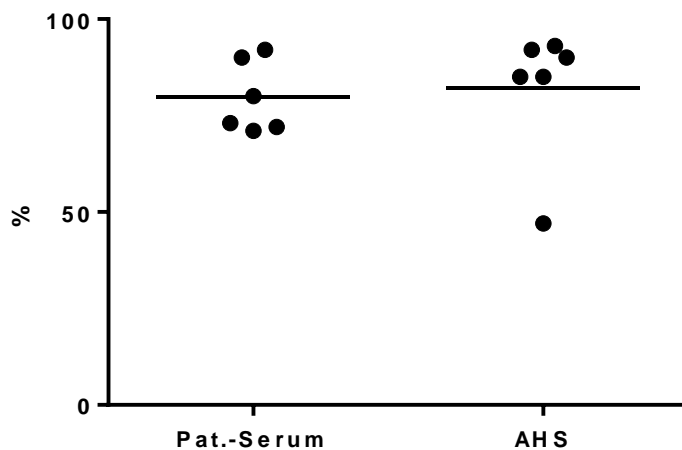


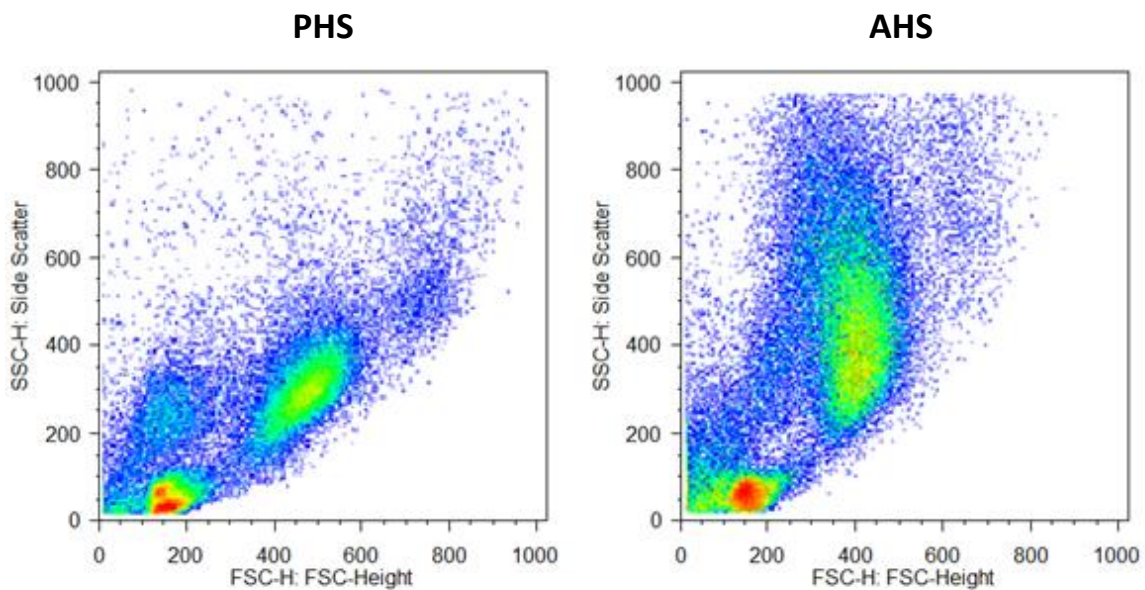
Abb. 4.3 DC Viabilität gesunder Probanden. Die Ernte von AHS-DCs ($82\% \pm 16,0\%$), gewonnen aus gesunden Probanden zeigte im Vergleich zu DCs, die in einem **Medium mit AML Patientenserum** generiert wurden ($79,7\% \pm 8,5\%$, ns, $p=0,72$) keinen Unterschied.

4.3. Durchflußzytometrie und Phänotyp-Analyse

4.3.1. Vorwärts-/ Seitwärts Scatter

Bei der Durchflußzytometrie zeigten sich zunächst im Vorwärts-/Seitwärts Scatter Auffälligkeiten. Bei 7 von 23 Ansätzen fielen deutliche Unterschiede zwischen PHS-DCs und AHS-DCs (Serum gesunder Probanden) auf. Diese äußerten sich durch eine erhöhte Zellkörnung auf Seiten der AHS-DCs. Als Beleg für diese Unterschiede sind in Abb. 5.1, 5.2 und 5.3 ausgewählte repräsentative Vorwärts-/Seitwärts-Scatter Profile dargestellt.

Bsp. 1



Bsp. 2

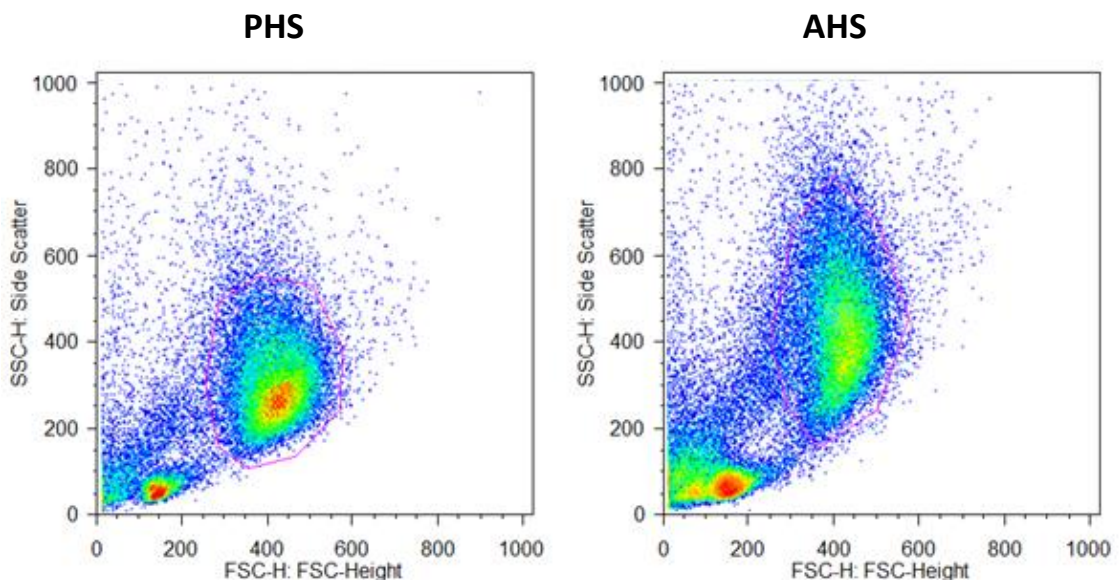
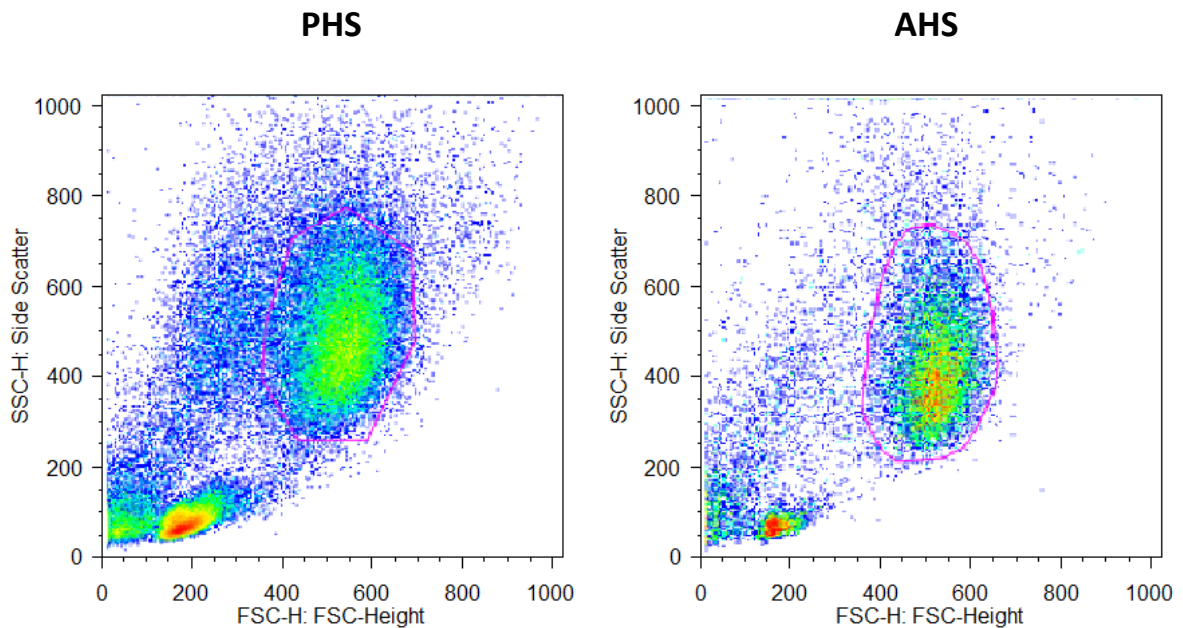


Abb. 5.1. Unterschiede bei der Durchflusszytometrie. Im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter zeigten bei 7 von 23 DC-Ansätzen die AHS-DCs einen prominenten Shift (=erhöhte Heterogenität bzgl. Granularität und Größe der DC-Zellpopulation) im Vergleich zu den PHS-DCs (Exemplarisch zwei repräsentative Ansätze zweier Probanden im Vergleich).

Bei weiteren 6 von 23 Ansätzen zeigten sich im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter geringfügigere Unterschiede (Unterschiede im Shift geringer ausgeprägt) zwischen den Ansätzen.

Bsp. 1



Bsp. 2

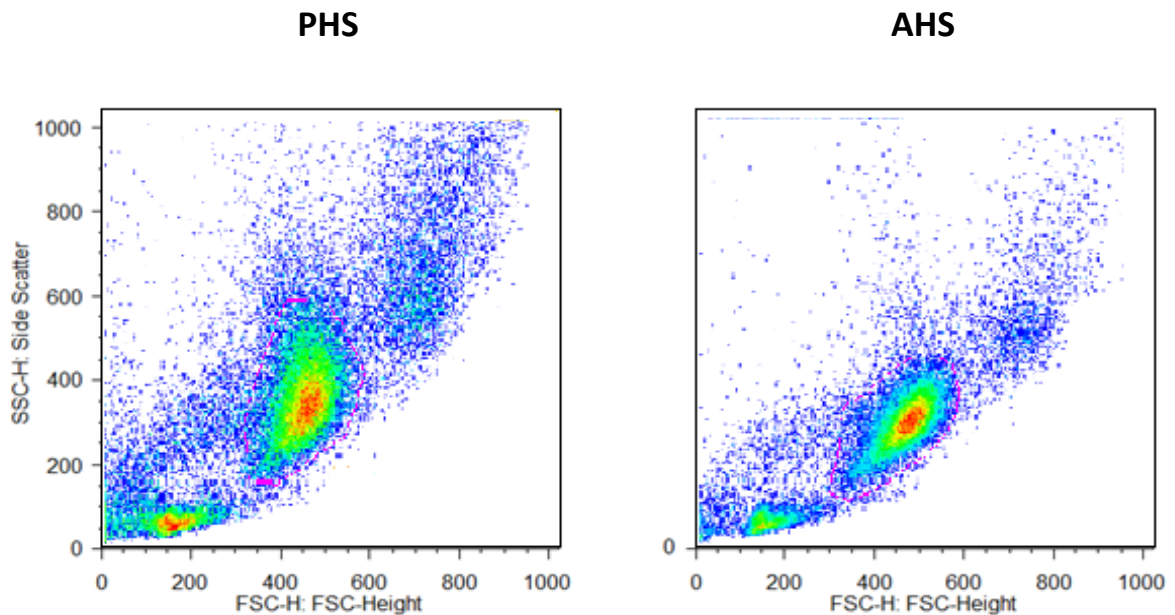
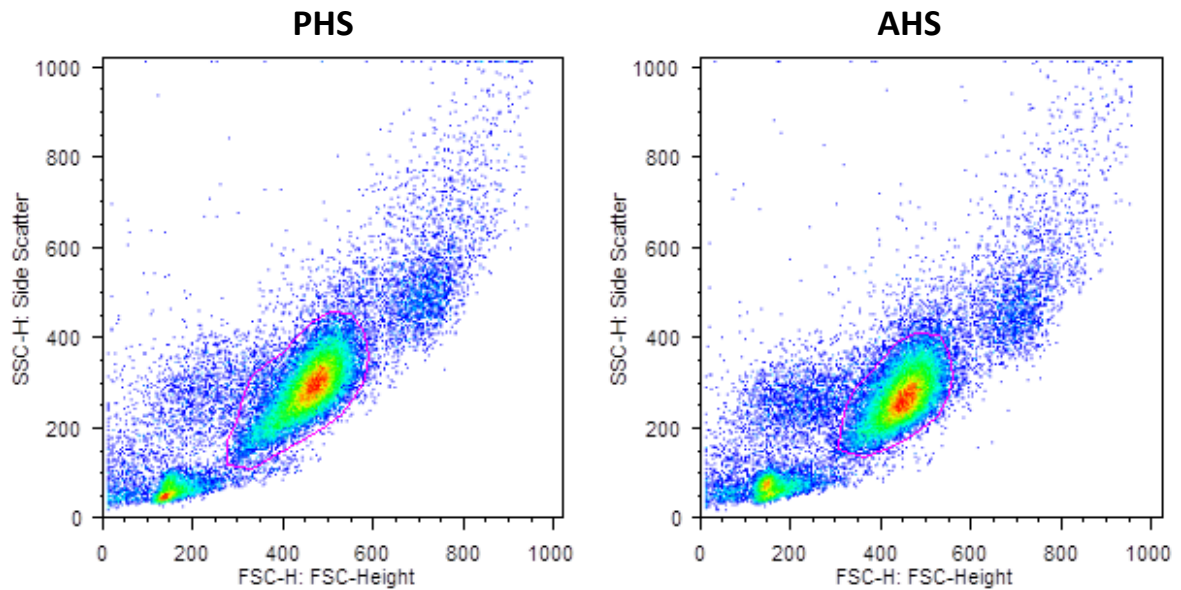


Abb. 5.2. Unterschiede bei der Durchflusszytometrie. Im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter zeigten bei 6 von 23 DC-Ansätzen die AHS-DCs geringfügigere Unterschiede (kein prominenter Shift = geringere Heterogenität bzgl. Granularität/Körnung und Größe der Zellen) im Vergleich zu den PHS-DCs (Exemplarisch je zwei repräsentative Ansätze zweier Probanden im Vergleich).

Bei den übrigen 10 von 23 Ansätzen zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den AHS-DCs und PHS-DCs.

Bsp. 1



Bsp. 2

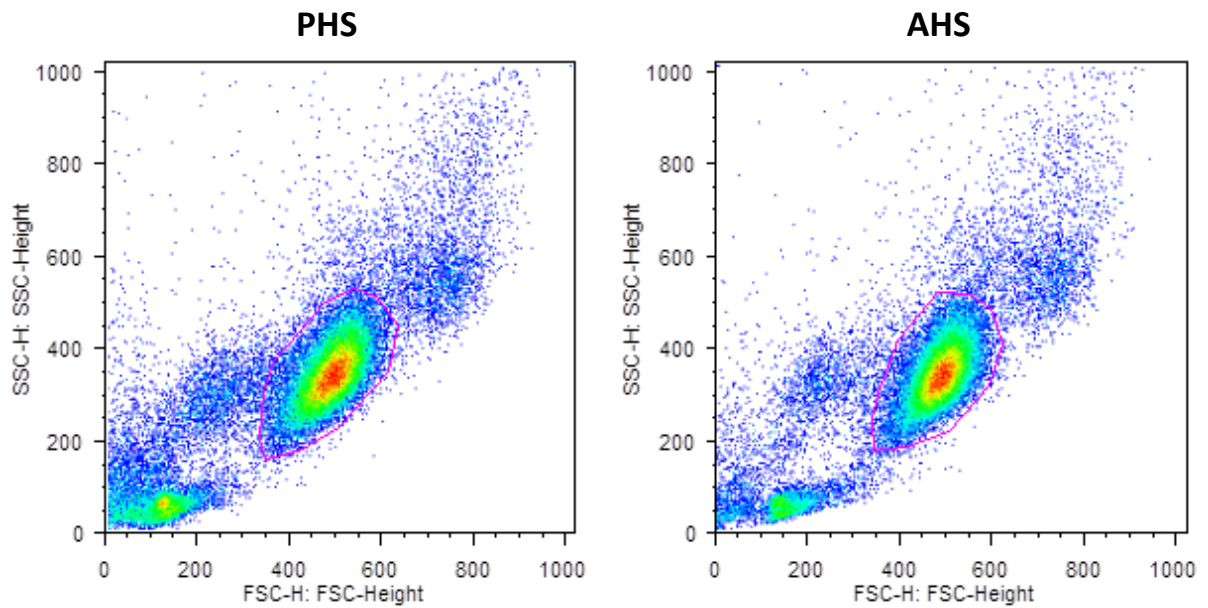


Abb. 5.3. Unterschiede bei der Durchflusszytometrie. Im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter zeigten bei 10 von 23 DC-Ansätzen die AHS-DCs keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu den PHS-DCs. (Exemplarisch zwei repräsentative Ansätze zweier Probanden im Vergleich).

4.3.2. Phänotyp Analyse

Bei der Phänotyp Analyse von Oberflächenmarkern für dendritische Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den AHS-DCs und PHS-DCs festgestellt.

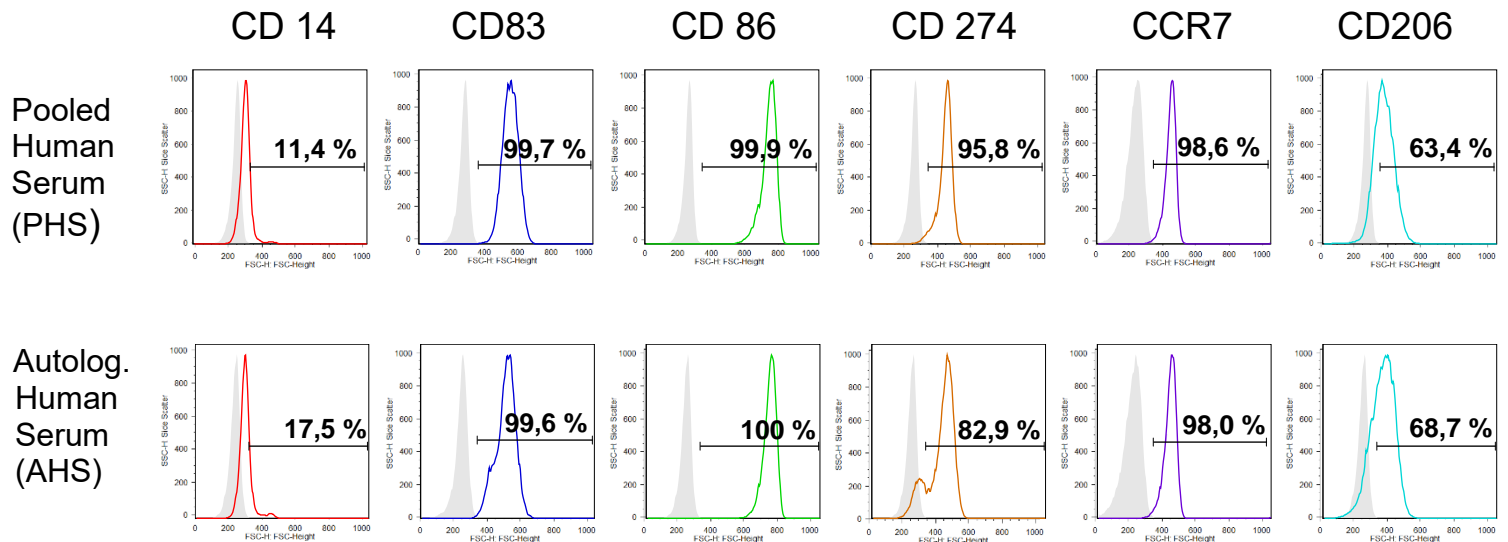


Abb. 6.1. Phänotyp-Analyse. Mittels Durchflusszytometrie fanden wir keine signifikanten Unterschiede zwischen PHS-DCs und AHS-DCs bezüglich der Expression wichtiger Oberflächenproteine (Cluster of Differentiation). Exemplarisch ist ein Ansatz im Vergleich aufgeführt.

Tabelle 2.1.: Übersicht zu den von uns untersuchten Cluster of Differentiation

CD 14	Exprimiert auf Monozyten, Makrophagen, Mikroglia etc.
CD 83	Exprimiert auf Dendritischen Zellen (Thymus, zirkulierende, Microglia, Langerhans Zellen etc.)
CD 86	Exprimiert auf antigen-präsentierenden Zellen, costimulatorisch bei der Aktivierung von T-Zellen von Bedeutung
CD 274 (= PD-L1)	Exprimiert auf diversen immunregulierenden Zellen, immunsuppressiv
CCR7	Bei stimulierten DCs hochreguliertes Oberflächenantigen
CD206	Exprimiert auf Human-monocyte-derived DCs, unreifen DCs, Makrophagen, Mesangiumzellen, retinales Pigmentepithel etc.

4.4. Signal 3 Assay und ELISA IL-10/IL-12

Wie schon im Methodenteil beschrieben, wurde bei diesem Versuch die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen simuliert (Signal 3 Assay). In den Überständen der Maturierung und des Signal 3 Assays wurde anschließend mittels ELISA die IL-10 und IL-12 Konzentrationen der AHS-DCs und PHS-DCs verglichen, um deren Funktionalität genauer zu untersuchen. Hier stellten wir abermals einen signifikanten Unterschied zwischen PHS-DCs und AHS-DCs bei den Konzentrationen von IL-12 (wichtiger funktioneller Marker für die DCs-T-Zell Interaktion), fest. Für das immunsuppressive IL-10 fand sich kein signifikanter Unterschied. In Abbildung 7.1 und 7.2 werden die Konzentrationsunterschiede des IL-12 bezüglich der unterschiedlichen Ansätze dargestellt.

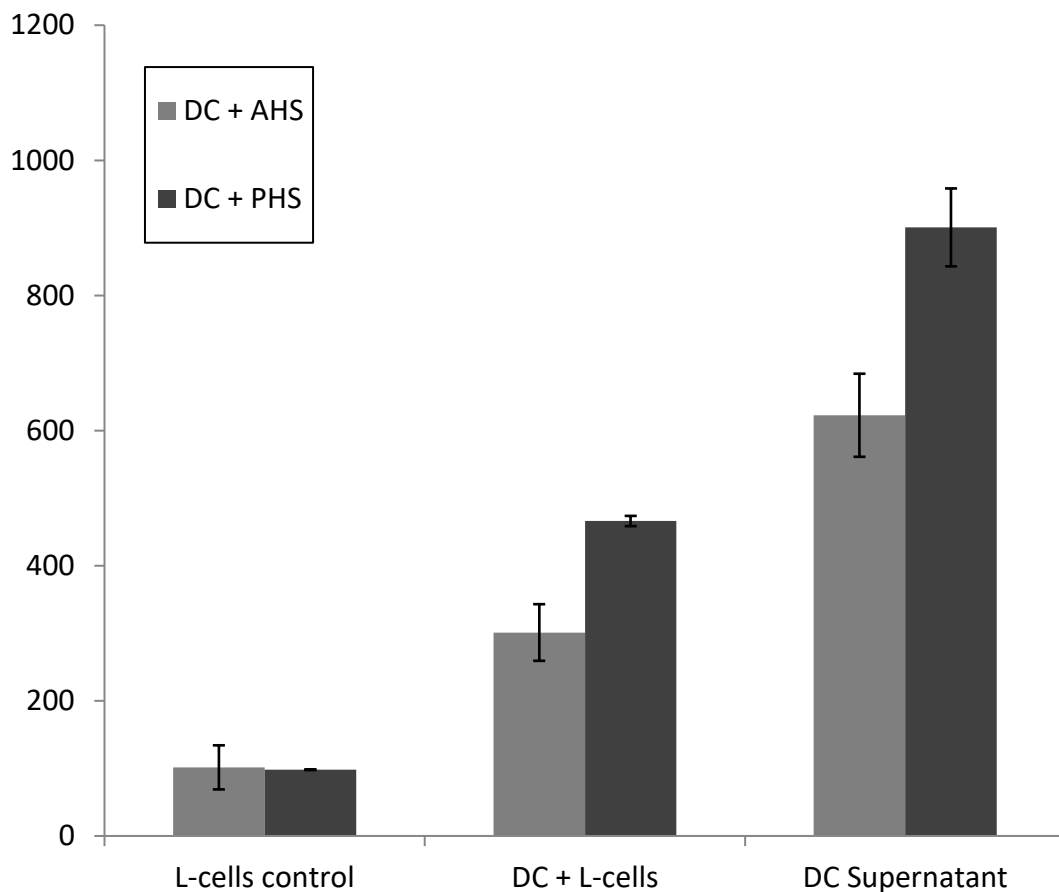


Abb. 7.1. IL-12 Konzentrationen mittels ELISA in pg/μl. Exemplarische Darstellung eines Ansatzes. L-Cells control = Ansatz der Fibroblasten ohne DCs, mit AHS 101,54 pg/μl ± 74,32 pg/μl mit PHS 98,08 pg/μl ± 3,49 pg/μl. DC + L-Cells = DCs mit Fibroblasten inkubiert, mit AHS: 301,15 pg/μl ± 96,63 pg/μl, mit PHS: 466,15 pg/μl ± 18 pg/μl. DC Supernatant = Überstand nach DC Maturierung, mit AHS: 622,69 pg/μl ± 123,32 pg/μl, mit PHS: 900,77 pg/μl ± 118 pg/μl (Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus Triplikaten)

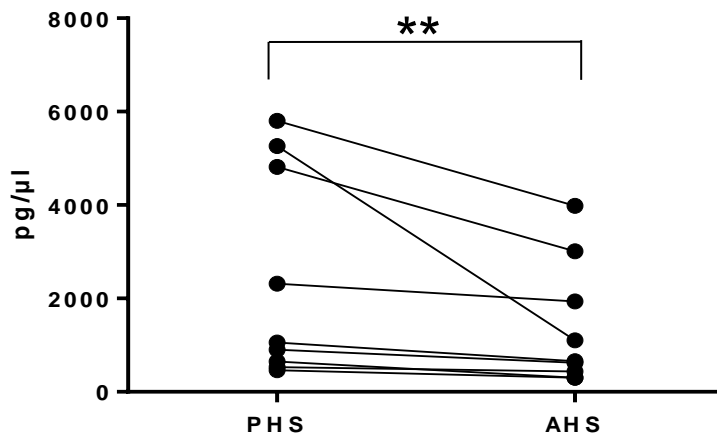


Abb. 7.2. IL-12 Konzentrationen mittels ELISA. Der Ratio Paired T-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen PHS-DCs und AHS-DCs ($p=0,0052$). PHS-DCs produzierten deutlich höhere Konzentrationen an IL-12, welches ein Schlüsselinterleukin für die Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen darstellt.

4.5. Migration Assay

Ein wichtiger Parameter für die funktionelle Aktivität dendritischer Zellen ist die Fähigkeit durch eine Transwell Migrationskammer zu wandern (siehe Material und Methoden, hier dargestellt in Abb. 8.1 und 8.2)

Diese Migrationsfähigkeit der verschiedenen DC Ansätze zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede, die für den Einsatz von Pooled Human Serum zur Generierung sprechen.

Es wurde kein signifikanter Unterschied bei der spontanen Migrationsfähigkeit der unterschiedlichen Ansätze festgestellt. Bei der Migration zum Chemokin CCL19 allerdings zeigten die AHS-DCs ein signifikant geringeres migratorisches Potential ($p=0,006$).

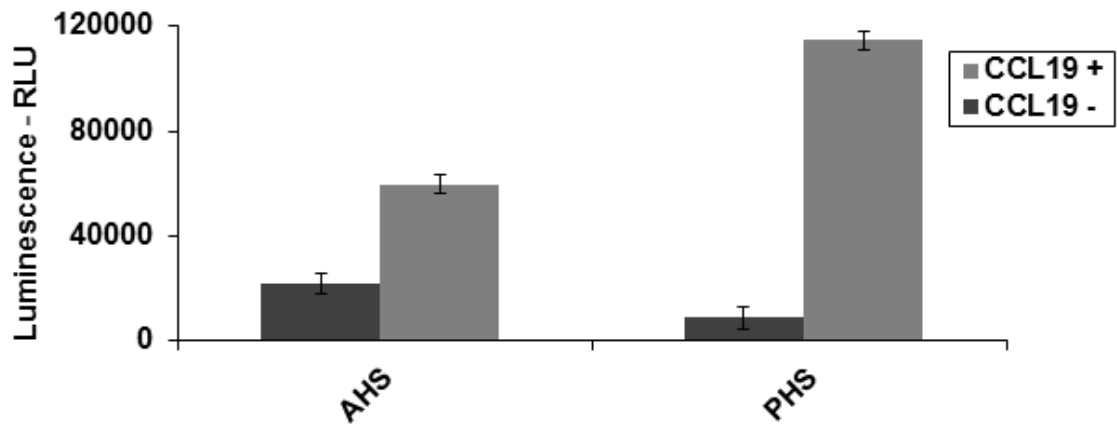


Abb. 8.1. Migrationsfähigkeit verschiedener Ansätze. Exemplarische Darstellung eines Migrationsassays. PHS-DCs ($114881,34 \text{ RLU} \pm 8312,96 \text{ RLU}$) migrieren stärker zum Chemokin CCL19 als AHS-DCs ($59686,68 \text{ RLU} \pm 7738,29 \text{ RLU}$), Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus Triplikaten, CCL19- = zur Kontrolle ohne CCL19

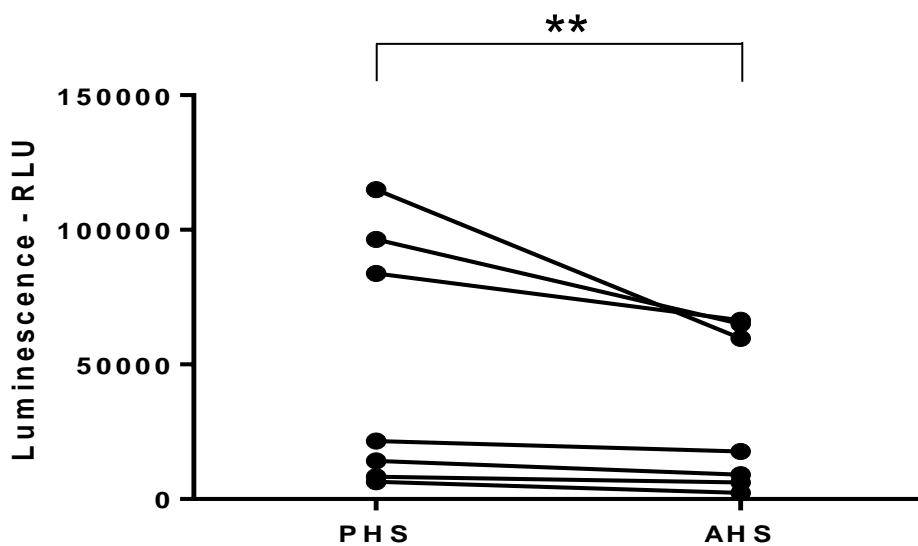


Abb. 8.2. Migrationsfähigkeit verschiedener Ansätze. AHS-DCs zeigten ein geringeres migratorisches Potential zum Chemokin CCL19 ($p=0.006$).

5. Diskussion

DC basierte Immuntherapie war in den letzten Jahren auf vielfältigen Gebieten der Medizin Gegenstand intensiver Forschung. Spätestens seitdem 1996 erste Therapieerfolge bei B-Zell-Lymphomen beschrieben wurden, erkannte man das therapeutische Potential für die Hämatologie [9]. Obwohl viele Patienten eine Immunreaktion zeigten, waren die klinischen Ergebnisse begrenzt. Die Vermutung liegt daher nahe, dass hierbei die Interaktion zwischen den autologen DCs und den TH1-Zellen bzw. NK Zellen gestört ist. Da eine erfolgreiche Interaktion in hohem Maße von der Qualität und Funktionalität der DCs abhängt, haben wir verschiedene Generierungsansätze genauer untersucht. Bereits 2003 wurde evaluiert, dass ein dreitägiger Ansatz zur Generierung ausreichend ist [26]. Beim Maturationsprozess fielen uns zunächst Unterschiede zwischen den PHS-DCs und den AHS-DCs im Vorwärts-/Seitwärts Scatter der Durchflusszytometrie bezüglich der Körnung auf. Dies veranlasste uns dazu, die unterschiedlichen Ansätze umfassender zu untersuchen, da prinzipiell ein geschlossenes autologes System zur in vitro Züchtung der DCs (PBMCs und Seren vom selben Spender) bezüglich der GMP Leitfäden vorteilhaft wäre. Auch theoretische infektiologische Risiken könnte man so minimieren. Allerdings zeigten DCs, die in einem Medium mit dem Zusatz von PHS generiert wurden, eine signifikant erhöhte Viabilität ($92\% \pm 5.6\%$) verglichen mit den DCs die mit autologem Serum ($82\% \pm 9.8\%$) gezüchtet wurden ($p=0.003$). Ähnlich verhielt es sich bei der Zellernte. Die Recovery von AHS-DCs bei gesunden Probanden war signifikant geringer ($3,7\% \pm 2,2\%$), als die der PHS-DCs ($7,0\% \pm 5,4\%$; $p=0,006$). AHS-DCs von gesunden Spendern zeigte bezüglich der Viabilität und der Recovery keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu DCs, die mit autologem Patientenserum (AML-Serum) gezüchtet wurden. Interessanterweise konnte eine äquivalente Studie, bei der die Züchtung von Chondrozyten zum Gelenksknorpelersatz untersucht wurde, gleiche Tendenzen feststellen. Die durchschnittliche Recovery von PHS-Chondrozyten (41×10^6) war signifikant höher als AHS-Chondrozyten (28×10^6) und diese war wiederum höher als die Recovery von Chondrozyten, die mit dem Zusatz von Fetal Bovine Serum (Abk.: FBS) maturiert wurden (4×10^6) [33]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass es sich bei den Unterschieden nicht um

zellspezifische (also nicht um DC-spezifische) Eigenschaften handelt. Es liegt nahe, dass PHS als Zusatz bei der Züchtung verschiedener Zellreihen geeigneter sind, als die autologen Seren von Einzelpersonen.

Im Gegensatz zu den Unterschieden des Vorwärts-/Seitwärts Scatters der Durchflusszytometrie wurden bei den Phänotyp-Analysen der wichtigen DC Marker keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Allerdings zeigten sich bei der Simulation der Interaktion von DCs und T-Zellen durch CD40L-Fibroblasten bei der Messung der IL-12 und IL-10 Konzentrationen sehr wohl funktionelle Unterschiede. Während sich die IL-10 Konzentrationen für alle Zellreihen bei unter 16 pg/μl befanden, konnte bei den funktionell wichtigen IL-12 Konzentrationen für die unterschiedlichen DC Ansätze Differenzen festgestellt werden. Die IL-12 Produktion ist von entscheidender Bedeutung und für die Interaktion der DCs und TH1-Zellen bzw. NK-T-Zellen essentiell. Auch hier zeigten die PHS-DCs eine signifikant höhere Sekretion dieses wichtigen Zytokins. Ebenso wertvoll für die Funktionalität ist die Migrationsfähigkeit der dendritischen Zellen. Hier zeigt sich die Wanderungsfähigkeit innerhalb des Lymphsystems und somit ist auch hiervon der Therapieerfolg maßgeblich abhängig. Auch in diesem Assay waren die PHS-DCs im Vergleich zu den AHS-DCs im Vorteil.

Eine vergleichbare Arbeit aus dem Jahr 2014, untersuchte ebenfalls die Züchtung dendritischer Zellen aus AML Patienten anhand der Seren genauer. Die Arbeitsgruppe verglich die Zugabe von Autologen Seren und serum-free Medium (SFM), (Invitrogen, CA, USA, CellGro oder X-Vivo) [34]. Ihre Ergebnisse zeigten signifikante Vorteile für DCs, die in SFM generiert wurden. Es zeigte sich auch hier, dass AHS nachteilig ist. Allerdings wurde hier ein 7-tägiges Protokoll zur Generierung, im Vergleich zu unserem 3-tägigen Protokoll, verwendet [16], [34]. Die durchschnittliche Viabilität der DCs lag bei gesunden Spendern bei $(72.66\% \pm 12.82)$, im Gegensatz zu unseren PHS-DCs gesunder Spender $(92\% \pm 5,6\%)$. Dendritische Zellen, die mittels K562 Zellen stimuliert wurden (s.o. Signal 3 Assay), zeigten unter Zugabe autologer Seren höhere Level des immunsuppressiven Zytokins IL-10 und niedrigere Level des immunvermittelnden Zytokins IL-12. Unter Verwendung von SFM zeigte sich vice versa höhere Level an IL-12 und niedrigere Konzentrationen an IL-10. Die Konzentrationen von IL-12 waren allerdings auf niedrigerem Niveau, als unter unserem 3-tägigen Protokoll und unter Stimulierung durch CD40L Fibroblasten [16], [33].

Insgesamt wurde bei den Messungen deutlich, dass die Verwendung des Pooled Human Serum bei der Generierung von DCs in vielerlei Hinsicht bessere Ergebnisse hervorbrachte. Nun stellt sich die Frage nach dem Grund für solche signifikanten Unterschiede zwischen dem PHS und dem AHS. Da das gepoolte Serum ein Gemisch aus Seren verschiedener gesunder Spender ist, kann man davon ausgehen, dass unter anderem der gemittelte Wert an Proteinen [insg. ca 7%: 45 –65% Albumin, 2 –5% α 1-Globuline (Lipidtransport), 7 -10% α 2-Globuline (Eisentransport, Kupfertransport), 9 –12% β -Globuline (Eisentransport, Lipidtransport), 12 –20 % γ -Globuline (Immunabwehr)], Elektrolyte, Stoffwechselprodukte (z.B. Harnstoff), Hormone und Zytokine im Gemisch eine optimalere Grundlage für die Züchtung von DCs bildet, als die des autologen Serums, das von einem der jeweiligen Spender gewonnen wurde [38]. Dies würde auch erklären weshalb in Einzelfällen, die Ergebnisse des AHS vorteilhaft erschienen. Diese wenigen Spender beherbergen vermutlich ein positiv-stimulierendes Milieu (im Sinne von im Serum vorhandenen Zytokinkonzentrationen, Antikörpernachweisen, Elektrolytkonzentrationen, etc.) z.B. für die Heranreifung dendritischer Zellen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass in Seren, sowohl von kranken als auch von gesunden Spendern, Autoantikörper gegen diverse Zytokine vorhanden sein können und diese somit das positiv-stimulierendes Milieu für die Reifung dendritischer Zellen beeinflussen könnten [35].

Für weitere Erkenntnisse sind weitere Untersuchungen von Bedeutung. Um spezifische Unterschiede der Seren zu ermitteln wären spektrometrische Assays nötig, um beispielsweise Differenzen beim Elektrolytgehalt [Natrium (Na), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Kalium (K), Eisen (Fe), Zink (Zn), Kupfer (Cu), Selen (Se), und andere] zu ermitteln, die eventuell einen Einfluss bei der Züchtung von DCs auf molekularer Ebene, haben [36], [37]. Andere Faktoren, die in der interzellulären Kommunikation und Reifung wichtig sind, wie zum Beispiel Exosomen und MicroRNAs spielen wahrscheinlich auch eine Rolle.

6. Zusammenfassung

Auch im Jahr 2016 ist die AML häufig unheilbar. Neue Therapieansätze sind dringend erforderlich. In Remission ist die Tumorlast gering. Deshalb könnte Immuntherapie besonders effektiv sein. In dieser Situation, wenn die Leukämie im Stadium der MRD ist, kann Immuntherapie mit Dendritischen Zellen (DCs) die minimale Zelllast der entarteten myeloischen Zellen weiter reduzieren oder ganz beseitigen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien für die in vitro Generierung und Reifung der DCs entwickelt. Bei der Optimierung dieser Protokolle im Sinne der GMP, sind wir unter Verwendung von Pooled Human Serum (PHS) und dem autologem Humanserum (AHS) von einzelnen Spendern auf interessante Unterschiede gestoßen.

Zur Gewinnung der DCs wurden periphere Blutzellen (PBMCs) von insgesamt 17 Probanden (3 AML Patienten in Remission und 14 gesunden Spendern) entnommen. Außerdem wurde Serum von insgesamt 20 Probanden (6 AML Patienten in Remission und 14 gesunden Spendern) gewonnen. Dies erfolgte nach schriftlicher Einwilligung aller Spender. Ein dreitägiges Protokoll für die Generation Dendritischer Zellen aus Monozyten wurde angewandt, basierend auf einem Zytokincocktail mit synthetischen TLR7/8-Agonisten. Während der dreitägigen Kultur wurde RPMI mit 1,5% PHS oder 1,5% AHS (von gesunden Spendern oder von AML Patienten) hinzugegeben. Nach der Zellernte, wurden Zellzahl und Viabilität der DCs, mittels Trypanblau Exklusionstest bestimmt. Des Weiteren wurde der Phänotyp mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um funktionelle Differenzen zu ermitteln, wendeten wir einen Migrationsassay und einen Signal-3-Assay an, die die funktionelle Aktivität der DCs gemessen haben.

Wir stellten fest, dass DCs, die in Medium mit PHS generiert wurden, eine signifikant höhere Viabilität (91%, SD ± 5.5) zeigten verglichen mit den DCs, die mit Zugabe von AHS gezüchtet wurden (81%, SD ± 9.5) ($p=0.002$). Die Zellernte von PHS-DCs war ebenso signifikant größer, als die der AHS-DCs. Phänotypisch konnten wir keine Unterschiede im Expressionsprofil von DC-Markern und entsprechenden kostimulatorischen Molekülen feststellen (CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD206, CD209, CD273, CD274, CCR7 and HLA-

DR). Allerdings tendierten die PHS-DCs, verglichen mit den AHS-DCs zu vermehrter IL-12 Produktion ($p=0,0052$). Gleichmaßen zeigten PHS-DCs auch eine signifikant erhöhte Migrationsrate ($p=0,006$).

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse einen klaren Vorteil für die Verwendung von PHS zur Generation von DCs. Somit sollte PHS gegenüber dem autologen Humanserum für die Generierung von DCs zur Immuntherapie den Vorzug erhalten. Wie wir hier zeigen, ist PHS für die Reifung der DCs überlegen und deshalb für den klinischen Einsatz zu empfehlen.

7. Danksagung

Für die herausragende Betreuung während meiner Doktorarbeit und der Forschungstätigkeit im Helmholtz-Institut bedanke ich mich bei meinen Betreuern. Insbesondere gilt mein Dank an dieser Stelle Frau Prof. Dr. med. M. Subklewe und Frau Dr. rer. nat. B. Beck. Auch das freundliche, unterstützende und kollegiale Umfeld im Rahmen der Arbeit ist hervorzuheben.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die stets unterstützend an meiner Seite steht.

ABSTRACT FÜR DIE POSTERPRÄSENTATION DES JÄHRLICHEN MEETINGS DER AMERIKANISCHEN GESELLSCHAFT FÜR HÄMATOLOGIE (ASH) IN NEW ORLEANS, 7. - 10.12.2013

Felix S Lichtenegger, MD^{1,2,3}, Barbara Beck, PhD^{3,4*}, Christiane Geiger, PhD^{5*}, Dieter Munker^{3,4*}, Miriam Schlueter^{3,4*}, Rika Draenert, MD^{6*}, Frauke Schnorfeil, PhD^{4*}, Gunnar Kvalheim, MD, PhD⁷, Wolfgang Hiddemann, MD, PhD³, Dolores J Schendel, PhD^{5*} and Marion Subklewe, MD^{3,4}*

¹Clinical Cooperation Group Immunotherapy, Helmholtz Institute Munich, Munich, Germany

²Division of Clinical Pharmacology, Department of Internal Medicine IV, Klinikum der Universität München, Munich, Germany

³Department of Internal Medicine III, Klinikum der Universität München, Munich, Germany

⁴Clinical Co-operation Group Immunotherapy, Helmholtz Institute Munich, Munich, Germany

⁵Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Institute Munich, Munich, Germany

⁶Division of Clinical Infectiology, Department of Internal Medicine IV, Klinikum der Universität München, Munich, Germany

⁷Department of Cellular Therapy, Oslo University Hospital Radiumhospitalet, Oslo, Norway

Dendritic cell (DC) vaccination is considered a promising immunotherapeutic strategy for AML patients with minimal residual disease (MRD). We have developed a three-day manufacturing protocol containing a synthetic TLR7/8 agonist to generate DCs with a positive costimulatory profile and high IL-12p70 secretion (TLR-DCs). These proved to be superior with respect to type 1 polarization of T cells and activation of NK cells compared to conventional monocyte-derived DCs.

In an attempt to further optimize the maturation protocol, we compared the use of standard pooled human serum (PHS) with autologous human serum (AHS) from healthy donors (HDs, n=16) and AML patients (n=6) within the generation process of TLR-DCs. Surprisingly, we found that AHS-DCs from HDs were significantly inferior to PHS-DCs concerning viability (81% vs. 91%, p=0.002) and recovery (3.8% vs. 7.1%, p=0.037) after the maturation process. A similar effect was seen in AHS-DCs from AML patients. In a functional analysis, IL-12p70 secretion was reduced and migratory capacity of the DCs to CCL19 was impaired. We are currently working on the identification of immunomodulatory components within the AHS that are responsible for these detrimental effects. In a preliminary cytokine analysis, we found that pro-inflammatory (TNF- α) as well as anti-inflammatory (IL-10) cytokines were significantly increased in the AHS samples.

PHS is therefore highly recommendable for the maturation process and was used in all subsequent experiments. With this protocol, we were able to show that TLR-DCs can also be generated from monocytes of AML patients. No differences in phenotype and function were found compared to samples from healthy blood donors. Efficient and controllable expression of leukemia-associated antigens was induced by RNA electroporation. These cells are capable of both priming naïve T cells and reactivating antigen-specific pre-primed effector cells *in vitro* and are therefore highly suitable for DC vaccination strategies in the setting of postremission AML.

In order to further enhance the immunostimulatory capacity of TLR-DCs, we are currently evaluating combinatorial approaches with inhibitors of receptor-ligand immune checkpoints. Their high therapeutic potential has recently been demonstrated for various tumor entities. In a comprehensive analysis of immune checkpoint molecules, it was revealed that TLR-DCs, albeit showing a preferentially positive costimulatory profile, express significant amounts of immunoinhibitory molecules from different families (PD-L1, B7-H3, HVEM, ILT3, ILT4, 4-1BBL). We have set up an *ex vivo* coculture system for activation and expansion of T cells by autologous DCs. Using blocking antibodies against PD-1, we could demonstrate a significant increase of IFN- γ secretion by T cells in samples of healthy donors and HIV patients as well as AML patients. The ultimate goal is to figure out which combination of immune checkpoint inhibitors is the most appropriate to increase the effect of a DC-based immunotherapy in the clinical setting of AML immunotherapy.

ABSTRACT FÜR DAS JÄHRLICHE HÄMATO-ONKOLOGISCHE SYMPOSIUM IN HERRSCHING 2013

(DIE VORLÄUFIGEN ERGEBNISSE WURDEN IM JÄHRLICHEN SYMPOSIUM DER MEDIZINISCHEN KLINIK III, (KLINIKUM GROßHADERN, LMU) IN HERRSCHING VORGETRAGEN)

BITTE ANKREUZEN: ☐ **KLINISCH** ☒ **X MOLEKULARBIOLOGISCH**

IMPACT OF AUTOLOGOUS VERSUS POOLED HUMAN SERUM ON DENDRITIC CELL GENERATION OF AML PATIENTS

D. Munker¹, B. Beck^{1,4}, F. S. Lichtenegger⁴, C. Geiger², I. Bigalke³, W. Hiddemann⁴, D. J. Schendel^{2,3}, M. Subklewe^{1,4}

¹ *Clinical cooperation group immunotherapy*, ² *Institute of Molecular Immunology and*

³ *GMP Unit, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany*

⁴ *Department of Internal Medicine III, University of Munich, Campus Großhadern, Munich, Germany*

Cellular immunotherapy with dendritic cells (DCs) is considered a promising therapeutic approach for AML patients with minimal residual disease (MRD). Several strategies have been developed for the *in vitro* generation and maturation of DCs. In order to further optimize these protocols, we compared the use of pooled human serum (PHS) with the donors' autologous human serum (AHS) within the generation process.

PBMCs were obtained from 3 AML patients and 16 healthy donors and serum was obtained from 6 AML patients and 16 healthy donors after written informed consent. A three-day protocol based on a cytokine cocktail containing a synthetic TLR7/8-agonist was used for the generation of monocyte-derived mature DCs. During this three-day period, RPMI was supplemented with 1.5% of either PHS, AHS from healthy donors or AHS from AML patients. After cell harvest, number and viability of DCs were determined using the trypan blue dye exclusion test. The phenotype was further analyzed by flow cytometry. In order to test for functional differences, a migration assay and a signal-3-assay to determine levels of IL-10 and IL-12 were performed.

DCs generated in PHS containing culture medium had a significantly increased viability (91%, SD \pm 5.5) compared to DCs generated using AHS (81%, SD \pm 9.5)($p=0.002$). Total cell yields of PHS matured DCs (Recovery: 7.1%, SD \pm 5.2) were also significantly higher than those matured with AHS (Recovery: 3.8%, SD \pm 2.4)($p=0.037$). In PHS cultured DCs tended to produce more IL-12 (not significant). Furthermore, DCs raised in PHS migrated more than those cultered in AHS ($p=0.006$). Staining of characteristic phenotypical markers (CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD206, CD209, CD273, CD274, CCR7 and HLA-DR) showed equal expression patterns.

These results demonstrate a clear advantage for the usage of PHS in generation of DCs. Its application is recommendable for the success of the maturation process and for the clinical use of DCs. In order to further investigate these differences, we are currently exploring individual soluble factors within the serum collected from AML patients compared to healthy donors.

8. Literaturverzeichnis

1. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
2. Galluzzi, L., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(7): p. 1111-1134.
3. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
4. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.
5. Ben J.C. Quah, H.C.O.N., *Maturation of function in dendritic cells fortolerance and immunity*. J. Cell. Mol. Med. , 2005. **9**: p. pp. 643-654.
6. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 296-306.
7. Melief, C.J., *Cancer immunotherapy by dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 372-83.
8. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 138-47.
9. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(1): p. 52-8.
10. Le Floch, A., et al., *Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 559-70.
11. Murphy, G., et al., *Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen*. Prostate, 1996. **29**(6): p. 371-80.
12. Schott, M., et al., *Dendritic cell immunotherapy in a neuroendocrine pancreas carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2001. **55**(2): p. 271-7.
13. Palucka, A.K., et al., *Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity*. J Immunother, 2006. **29**(5): p. 545-57.
14. Wimmers, F., et al., *Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From in vitro Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 165.
15. Schreiber, G., et al., *Commonly used prophylactic vaccines as an alternative for synthetically produced TLR ligands to mature monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2010. **116**(4): p. 564-74.
16. Han, R.X., et al., *Effectiveness and safety of chemotherapy combined with dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108958.
17. Subklewe, M., et al., *New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(10): p. 1093-103.
18. Van Tendeloo VF, V.d.V.A., Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, Gostick E, Vermeulen K, Pieters K, Nijs G, Stein B, Smits EL, Schroyens WA, Gadisseur AP, Vrelust I, Jorens PG, Goossens H, de Vries IJ, Price DA, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Berneman ZN, *Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2010. **107**(31): p. 13824-9.
19. Lichtenegger, F.S., et al., *Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia*. Semin Hematol, 2015. **52**(3): p. 207-14.

20. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
21. Tallman, M.S. and J.K. Altman, *Curative strategies in acute promyelocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 391-9.
22. Rowe, J.M., *Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 396-405.
23. Han, C.S., et al., *Varicella zoster infection after bone marrow transplantation: incidence, risk factors and complications*. Bone Marrow Transplant, 1994. **13**(3): p. 277-83.
24. Buchsel, P.C., E.W. Leum, and S.R. Randolph, *Delayed complications of bone marrow transplantation: an update*. Oncol Nurs Forum, 1996. **23**(8): p. 1267-91.
25. Keilholz U, L.A., Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, Hofmann WK, Uharek L, Thiel E, Scheibenbogen C., *A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS*. Blood, 2009. **113**(26):**6541-8**.
26. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4069-76.
27. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
28. Beck, B., et al., *Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 151.
29. Lichtenegger, F.S., et al., *CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44266.
30. Valenzuela, J.O., C.D. Hammerbeck, and M.F. Mescher, *Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 600-4.
31. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
32. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
33. *Autologous versus pooled human serum for articular chondrocyte growth*. 2008. **16**(2): p. 220-9.
34. da Silva Simoneti, G., S.T. Saad, and S.C. Gilli, *An efficient protocol for the generation of monocyte derived dendritic cells using serum-free media for clinical applications in post remission AML patients*. Ann Clin Lab Sci, 2014. **44**(2): p. 180-8.
35. Hansen, M.B., M. Svenson, and K. Bendtzen, *Serum-induced suppression of interferon (IFN) activity. Lack of evidence for the presence of specific autoantibodies to IFN-alpha in normal human sera*. Clin Exp Immunol, 1992. **88**(3): p. 559-62.
36. Harrington, J.M., et al., *Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: development of a mineralomics method*. Biol Trace Elem Res, 2014. **160**(1): p. 132-42.
37. Nielsen, C.H. and K. Bendtzen, *Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies : binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses*. Adv Exp Med Biol, 2012. **750**: p. 116-32.
38. Jan Behrends, Josef Bischofberger, Rainer Deutzmann, et al; *Physiologie (Duale Reihe). 2.Auflage*. Thieme, Stuttgart 2010.

Eidesstattliche Versicherung

Munker, Dieter Wolfgang

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Vergleich von autologem versus gepooltem Humanserum bei der
Generierung dendritischer Zellen zur therapeutischen Vakzinierung
bei Akuter Myeloischer Leukämie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand